

**Entwicklung und Anwendung von Methoden zur
pharmakokinetischen Untersuchung von Boswelliasäuren**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Vorgelegt von Heidemeier, Anke
aus Eichstätt

Giessen 2006

Aus dem Medizinischen Zentrum für Neurologie und Neurochirurgie
Neurochirurgische Klinik
Leiter: Prof. Dr. Böker
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. M. Winking
Gutachter: PD Dr. D. Häfner

Tag der Disputation: 29.09.2006

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	9
1.1.	Allgemeines	9
1.2.	Das Phytopharmakon "Weihrauch"	10
1.2.1.	Phytotherapeutika: Definition und Stellenwert in der Arzneitherapie	10
1.2.2.	Gewinnung des Weihrauchharzes	11
1.2.3.	Produktion und Verbreitung von Weihrauch-Präparaten	13
1.3.	Boswelliasäuren als Arzneistoffe	14
1.3.1.	Boswelliasäuren als Inhaltsstoffe des "Weihrauchs"	14
1.3.2.	Pharmakologisches Wirkprinzip der β -Boswelliasäuren	15
1.3.3.	Zytotoxische Aktivität von Weihrauch-Extrakt bzw. reinen Boswelliasäuren	16
1.4.	Maligne Gliome	19
1.4.1.	Definition und Einteilung	19
1.4.2.	Epidemiologie	20
1.4.3.	Klinik und Diagnostik maligner Gliome	21
1.4.4.	Therapiestrategien bei malignen Gliomen	21
1.4.5.	Biologisches Verhalten der Tumoren und ihre Prognose	23
1.5.	Das peritumorale Hirnödem	25
1.5.1.	Klinische Bedeutung und Therapieoptionen	25
1.5.2.	Faktoren der Pathogenese des peritumoralen Ödems	26
1.5.3.	Leukotriene und ihre Rolle bei der Ödementstehung	27
1.5.4.	Leukotrien-Inhibitoren als antiödematöse Therapeutika	30
1.6.	Problemstellung der eigenen Arbeit	32
2.	Material und Methoden	33
2.1.	Materialien	33
2.1.1.	Chemikalien und biologische Materialien	33
2.1.2.	Labormaterialien und apparative Technik	33
2.1.3.	Instrumentarien zur HPLC und Massenspektrometrie	34
2.2.	Methoden	36
2.2.1.	Verfahrensweisen bei der HPLC-Analytik	36
2.2.1.1.	Systemeinstellungen der HPLC-Analytik	36
2.2.1.2.	Qualitätssicherung der Probenanalytik:	37
2.2.1.3.	Quantifizierung von Boswelliasäuren mittels HPLC	38
2.2.2.	Darstellung von KBA aus AKBA	39
2.2.3.	Stabilitätsprüfung der Boswelliasäuren	39
2.2.4.	Methodik zur Festphasenextraktion	40
2.2.5.	Extraktion von Boswelliasäuren aus Vollblut	42
2.2.5.1.	Extraktion der Boswelliasäuren aus Humanserum	42

2.2.5.2.	Analytik von KBA und AKBA aus humanem Blut über den Weg der Serum-Extraktion	43
2.2.5.3.	Analytik von KBA und AKBA aus Vollblut durch Ether-Extraktion	44
2.2.6.	Extraktion der Boswelliasäuren aus Hirngewebe	45
2.2.7.	Pharmakologische Aufbereitung zur Applikation der Boswelliasäuren im Tierexperiment	46
2.2.8.	Extraktion von AKBA und KBA aus Weihrauchextrakt H15	47
2.2.9.	Anwendungen der Nachweisverfahren aus Blut und Hirngewebe	49
2.2.9.1.	Blutuntersuchung bei Probanden nach Einnahme von H15.	49
2.2.9.2.	Applikation der Reinsubstanzen KBA und AKBA im Tierversuch	50
3.	Ergebnisse	52
3.1.	Qualitätssicherung von HPLC-Verfahren und Probenanalytik ..	52
3.2.	Ausbeute an KBA durch Deacetylierung von AKBA	58
3.3.	Stabilitätsprüfung der Boswelliasäuren	59
3.4.	Evaluation des Verfahrens zur Festphasenextraktion	62
3.5.	Effizienz der Nachweisverfahren aus Serum bzw. Vollblut	65
3.5.1.	Extraktion der Boswelliasäuren aus humanem Serum	65
3.5.2.	Analytik von KBA und AKBA aus Vollblut mittels Serumgewinnung	65
3.5.3.	Extraktion von KBA und AKBA aus Vollblut mittels Diethylether ..	66
3.6.	Extraktion der Boswelliasäuren aus Hirngewebe	72
3.7.	Formulierung für die Boswelliasäuren	76
3.8.	Analyse von KBA und AKBA aus H-15-Tabletten	77
3.9.	Anwendungen der entwickelten Verfahren	81
3.9.1.	Blutuntersuchung bei Probanden nach Einnahme von H15	81
3.9.2.	Detektion der Boswelliasäuren aus Blut und Hirngewebe im Tierversuch	87
4.	Diskussion	91
4.1.	Weihrauch-Extrakt in der klinischen Anwendung	91
4.1.1.	H15 in der Therapie von malignen Gliomen	91
4.1.2.	Vor- und Nachteile des Phytotherapeutikums Weihrauch	92
4.2.	Methoden und Ergebnisse der experimentellen Arbeit	94
4.2.1.	Verfahrenstechniken zur HPLC-Analytik	94
4.2.2.	Stabilität der Boswelliasäuren in Lösungen	96
4.2.3.	Analyse aus Tablettenmaterial von H15	96
4.2.4.	Extraktionsverfahren von KBA und AKBA aus Serum	97
4.2.5.	Extraktion von KBA und AKBA aus Vollblut	98
4.2.6.	Extraktion von KBA und AKBA aus Hirngewebe	99

4.2.7.	Pharmakokinetik von KBA	100
4.2.8.	Pharmakokinetik von AKBA	101
4.2.9.	Passage der Blut-Hirn-Schranke durch Boswelliasäuren	103
5.	Zusammenfassung	104
6.	Englischsprachige Zusammenfassung	105
7.	Literaturverzeichnis	106
8.	Abkürzungsverzeichnis	116
9.	Erklärung	117
10.	Lebenslauf	118
11.	Danksagung	119

Abbildungsverzeichnis:

1.	Afrikanische Art des Weihrauchbaums <i>Boswellia serrata</i>	12
2.	Weißes Rohharz von <i>Boswellia serrata</i>	13
3.	β -Boswelliasäuren, ihre Molekülstruktur und Molekularmassen.....	15
4.	Biosynthese der Leukotriene.....	28
5.	UV-Chromatogramme mit den Peaks von KBA und AKBA bei Substanzmengen von 1 mg und 100 ng (konventionelle HPLC).....	53
6.	UV-Chromatogramme mit den Peaks von KBA bei Substanzmengen von 25ng und 0,5 ng (Nano- HPLC), angekoppelte Massenspektrometrie.....	54
7.	UV-Chromatogramme mit den Peaks von AKBA bei Substanzmengen von 25 ng und 0,5 ng (Nano- HPLC), angekoppelte Massenspektrometrie.....	55
8.	Eichreihe von KBA und AKBA (konventionelle HPLC).....	56
9.	Eichreihe von KBA und AKBA (Nano-HPLC).....	57
10.	UV-Chromatogramm von KBA, welches aus AKBA durch Deacetylierung gewonnen wurde.....	58
11.	Substanzverluste von KBA und AKBA nach 8Std. und 24Std. Lagerung, gelöst in wässrigem Acetonitril (50:50,v/v).....	60
12.	Substanzverluste von KBA in Abhängigkeit vom Material des Probengefäßes durch Adsorption an eingesetzte Materialien.....	61
13.	UV-Chromatogramme von KBA und AKBA nach Durchführung der Festphasenextraktion mit verschiedenen Substanzmengen mit abgebildeter Negativkontrolle.....	63
14.	UV-Chromatogramme nach Extraktion aus markierten Blutproben mit den Peaks von KBA und AKBA.....	68
15.	Massenspektrometrische Identifikation von KBA und AKBA nach Extraktion aus markiertem Blut (1 μ g /2ml).....	69
16.	Extraktion aus nicht markiertem Hirngewebe (Negativkontrolle)...	73
17.	UV-Chromatogramm mit den Peaks von KBA und AKBA nach Extraktion von Hirngewebe, das mit 1 μ g KBA und AKBA markiert wurde.....	74

18.	UV-Chromatogramm der Extraktion aus 15mg einer H15-Tablette.....	77
19.	Massenspektrometrische Identifikation von KBA und AKBA aus dem Extrakt von H15.....	78
20.	UV-Chromatogramm einer Negativkontrolle (Extraktion aus Nicht markiertem Blut) im Vergleich zum UV-Chromatogramm einer Blutprobe des gleichen Probanden 2 Std. nach Medikation mit H15.....	82
21.	UV-Chromatogramme der Blutspiegel von Proband 1 nach Einnahme von 4 Tabletten H15 im Zeitverlauf.....	83
22.	Graphische Darstellung der Blutspiegel von KBA und AKBA im Zeitverlauf bei Proband 1	84
23.	Negativkontrollen: UV-Chromatogramme nach Ether-Extraktion aus nicht markiertem Blut von drei Ratten.....	88
24.	UV-Chromatogramme der Ether-Extraktion von Rattenblut nach oraler bzw. i.v.-Medikation der Tiere, unterlegt Chromatogramm einer Negativkontrolle.....	89
25.	UV-Chromatogramme der Extraktion des Hirngewebes nach oraler bzw. i.v.-Medikation der Tiere.....	90

Tabellenverzeichnis:

1. Mediane Überlebenszeit bei Hirntumoren in Abhängigkeit vom WHO-Grad I-IV.....	20
2. Wiederfindungsraten von KBA und AKBA nach Festphasenextraktion.....	64
3. Wiederfindungsraten von KBA und AKBA nach Etherextraktion aus 2 ml Blut.....	70
4. Standard-HPLC-Läufe mit definierten Mengen an KBA bzw. AKBA und Berechnung der Flächen (mV*min) ihrer UV-Peaks.....	71
5. Flächen der Peaks von KBA und AKBA im UV-Chromatogramm nach Extraktion aus markiertem Hirngewebe (mit Festphasenextraktion) und Berechnung der Wiederfindungsraten.....	75
6. Flächen der Peaks von KBA und AKBA im UV-Chromatogramm nach Extraktion von markiertem Hirngewebe (ohne Festphasenextraktion) und Berechnung der Wiederfindungsraten.....	75
7. Gemessene Flächen der Peaks von KBA und AKBA im UV-Chromatogramm nach Extraktion von nativen und markierten Proben des Weihrauchpräparates H15 (je 15 mg Tablettenmaterial).....	79
8. Berechnung der Wiederfindungsrate bei der Extraktion aus H15 (H15-Proben markiert mit 50 µg KBA und 2,5 µg AKBA).....	79
9. Berechnung des Gehaltes von KBA bzw. AKBA in einer H15-Tablette (400mg) anhand der Wiederfindungsrate des eingesetzten Extraktionsverfahrens.....	80
10. Blutspiegel an KBA bei Probanden nach oraler Einnahme von 1600mg H15 im Zeitverlauf (ng/ml).....	85
11. Blutspiegel an AKBA bei Probanden nach oraler Einnahme von 1600 mg H15 im Zeitverlauf (ng/ml).....	86

1. Einleitung

1.1. Allgemeines

In der Behandlung von malignen Gliomen wäre eine Verbesserung der therapeutischen Möglichkeiten durch neue bzw. zusätzliche Therapeutika sehr wünschenswert. Operative Techniken zur Resektion sowie strahlentherapeutische Behandlungsmethoden sind technisch hoch entwickelt, so dass entscheidende Fortschritte in Hinblick auf eine Verbesserung der Therapieergebnisse begrenzt sind. Daher kommt der Verbesserung von chemotherapeutischen Möglichkeiten und adjuvanten Therapieformen eine besondere Bedeutung zu. Die im Folgenden vorgestellte Arbeit befasst sich mit Arzneistoffen, welche bei der Behandlung von malignen Hirntumoren als adjuvante Therapeutika untersucht wurden. Es handelt sich bei diesen Arzneistoffen um Vertreter aus der Substanzgruppe der Boswelliasäuren. Diese pharmakologisch aktiven Verbindungen wurden als Inhaltsstoffe in Zubereitungen der pflanzlichen Droge „Weihrauch“ identifiziert. Bis heute werden Boswelliasäuren in der Praxis in Form eines pflanzlichen Heilmittels eingesetzt. Experimentelle Untersuchungen deckten Wirkmechanismen auf, welche diese Arzneistoffe als vielversprechende Agonisten zur Eindämmung eines perifokalen Hirnödems identifizierten (Ammon et al., 1993; Safayhi et al., 1996). Zusätzlich konnten Hinweise auf eine antiproliferative Wirksamkeit gefunden werden (Heldt et al., 1997; Shao et al., 1998; Huan et al., 2000).

In der vorliegenden experimentellen Arbeit wurden die beiden wichtigsten pharmakologischen Agonisten dieser Substanzgruppe – 11-keto- β -Boswelliasäure (KBA) und Acetyl-11-keto- β -Boswelliasäure (AKBA) – untersucht.

Dem experimentell-methodischen Teil der Arbeit wird ein Überblick über die Herkunft sowie über die chemischen und pharmakologischen Eigenschaften der Boswelliasäuren vorangestellt. In diesem Zusammenhang werden die Entität der malignen Hirntumorerkrankungen beschrieben sowie die Entstehung und Bedeutung des peritumoralen Hirnödems erläutert. Dabei wird die klinische Relevanz der Boswelliasäuren als antiödematöse und antiproliferative Arzneistoffe in der Behandlung von malignen Gliomen aufgezeigt. Es werden klinische Studien zum Einsatz von pflanzlichem Weihrauch-Extrakt (H15) in der Therapie von Patienten mit malignen Gliomen vorgestellt.

1.2. Das Phytopharmakon "Weihrauch"

1.2.1. Phytotherapeutika: Definition und Stellenwert in der Arzneitherapie

Phytopharmaka definieren sich als Zubereitungen aus Pflanzen bzw. Pflanzenteilen. Sie beinhalten naturgemäß eine Vielzahl von Substanzen, wobei häufig nur ein geringer Teil klassifizierter Inhaltsstoffe darunter ist. Gemäß des Verständnisses der Phytotherapie entspringt ihre arzneiliche Wirkung aus dem Zusammenspiel der verschiedenen Inhaltsstoffe, d.h. die pflanzlichen Arzneizubereitungen werden als eine wirksame Einheit betrachtet (Teuscher, 1997).

Phytotherapeutika werden am häufigsten in Form von Extrakten gewonnen. Mit Hilfe von geeigneten Lösungsmitteln werden dabei bestimmte Stoffgruppen aus dem Pflanzenmaterial extrahiert. Durch den Gehalt an sogenannten Leitsubstanzen beziehungsweise bekannten Wirkstoffen lassen sich

Phytotherapeutika standardisieren und somit mehr oder weniger exakt dosiert verabreichen (Teuscher, 1997).

Für Phytopharmaka gelten nach dem Arzneimittelgesetz grundsätzlich dieselben Anforderungen hinsichtlich pharmazeutischer Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit wie für chemisch-pharmazeutische Arzneimittel. Sie müssen einer Testung ihrer pharmakologischen Wirksamkeit und Verträglichkeit unterzogen werden und vor ihrer Zulassung müssen sie eine analytische, pharmakologische, toxikologische sowie eine klinische Prüfung durchlaufen (Teuscher, 1997).

Der Stellenwert von Phytopharmaka im Vergleich zu chemisch-pharmazeutischen Medikamenten ist schwer zu bestimmen. Als Mehr- und Vielstoffgemische rücken pflanzlichen Heilmittel in den Bereich der sogenannten Alternativ- oder Komplementärmedizin. Bemerkenswert ist das Vertrauen, das nicht selten von Patienten insbesondere diesen Heilmitteln entgegengebracht wird, wobei "alternative" Pharmaka typischerweise im Bereich chronischer Erkrankungen ihre Anwendung finden (Miehle, 1995).

1.2.2. Gewinnung des Weihrauchharzes

Ursprung des "Weihrauchs" ist das Harz der Weihrauchbäume (Abb.1). Diese gehören zur Familie der Balsamgewächse (Burseraceae) und sind der Gattung *Boswellia* zugeordnet. "Weihrauch" wird aus verschiedenen Arten der Stammpflanze gewonnen: Die Ursprungspflanze des "indischen Weihrauchs" ist *Boswellia serrata* Roxb., welche ihr primäres Verbreitungsgebiet in Indien besitzt. Somalia, Südarabien sowie Äthiopien sind Herkunftsländer von "Weihrauch", der hauptsächlich aus den Arten *Boswellia carterii* (B.sacra) und *Boswellia frereana* stammt. Die

Zusammensetzung des Gummiharzes und die Verteilung der Inhaltsstoffe kann abhängig von der Pflanzenart variieren (Kreck, 1999).

Die Gewinnung des Harzes erfolgt durch Einschneiden der Rinde von Stamm und kräftigen Ästen der Weihrauchbäume. Der austretende Milchsaft wird als Olibanum oder auch Gummi olibanum bezeichnet. Bei der Ernte des getrockneten Gummiharzes fallen verschiedene Qualitäten an, wobei zur Herstellung von Heilmitteln die weißlichen Harztränen ausgewählt werden. Aus dem getrockneten Rohharz (Abb.2) werden schließlich mittels Extraktion pflanzliche Trockenextrakte gewonnen.

Weihrauchbaum, Quelle des Weihrauchharzes:



Abb.1: Afrikanische Art des Weihrauchbaums *Boswellia serrata*
(Bild: DtÄrztebl 1998;95:A-30-31)

Weihrauch-Rohharz:

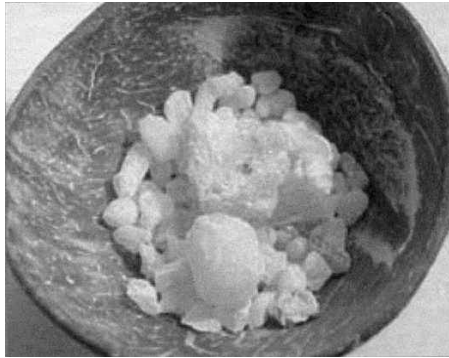


Abb.2: Weißes Rohharz von *Boswellia serrata*

(Bild:<http://www.grow.de/magazine/500/weihrauch/Wei>)

1.2.3. Produktion und Verbreitung von Weihrauch-Präparaten

International sind eine größere Anzahl verschiedener Zubereitungen sowie Kombinationspräparate aus der Rohdroge „Weihrauch“ erhältlich. Weihrauchprodukte werden zudem als homöopathische Zubereitungen, als Bestandteil von Salben sowie als Nahrungsergänzungsmittel vertrieben (Kreck, 1999).

In keinem Land der Europäischen Union besteht aktuell (2005) eine Zulassung für Weihrauch-Extrakt als Arzneimittel. Das Arzneimittelgesetz (AMG §73) erlaubt in Deutschland nur die Einfuhr von Pharmaka, welche in ihrem Herkunftsland über eine gültige Zulassung verfügen. In deutschen Apotheken kann Weihrauch-Extrakt unter dem Produktnamen "H15" über die Schweiz oder aus Indien bezogen werden. In Indien (Bombay) stellt die Firma Gufic Chem Pvt. Ltd. unter dem Handelsnamen "Sallaki" sowie "H15" Tabletten her, die ein Trockenextrakt aus dem Rohharz von *Boswellia serrata* enthalten. Sallaki ist in Indien ein für die Behandlung der chronischen Polyarthrititis zugelassenes

Arzneimittel. Das Produkt wird mit dem Namen "H15 Ayurvedica" in die Schweiz importiert und ist dort in einem Kanton - Appenzell-Außerrhoden - registriert.

1.3. Boswelliasäuren als Arzneistoffe

1.3.1. Boswelliasäuren als Inhaltsstoffe des "Weihrauchs"

Chemisch betrachtet gehören Boswelliasäuren zu den Terpenen, einer umfangreichen und in der Natur weit verbreiteten Stoffgruppe, welche weit mehr als 5000 bekannte Verbindungen umfaßt. Nach der Anzahl der beteiligten Grundbaueinheiten (Isoprenreste) lassen sich unter anderem Mono-, Sesqui-, Di- und Triterpene unterscheiden. Die Boswelliasäuren stellen pentacyklische Triterpene dar. Als Vertreter dieser Stoffgruppe sind sie mit den Steroiden verwandt (Teuscher, 1997).

Die wesentlichen, pharmakologisch interessanten Hauptvertreter im Harz von *Boswellia serrata* sind β -Boswelliasäure, Acetyl- β -Boswelliasäure, 11-keto- β -Boswelliasäure (KBA) und Acetyl-11-keto- β -Boswelliasäure (AKBA) (el-Khadem et al., 1972; Pardhy, 1978) (Abb.3). Die vorherrschende Form der Boswelliasäuren ist das β -Isomer, wobei auch Derivate der α -Boswelliasäure bekannt sind.

Die chemische und pharmakologische Reaktionsweise der einzelnen Boswelliasäuren wird bestimmt durch die 5-Ring-Struktur der Triterpene sowie die funktionellen Gruppen der Moleküle.

Molekülstruktur der β -Boswelliasäuren:

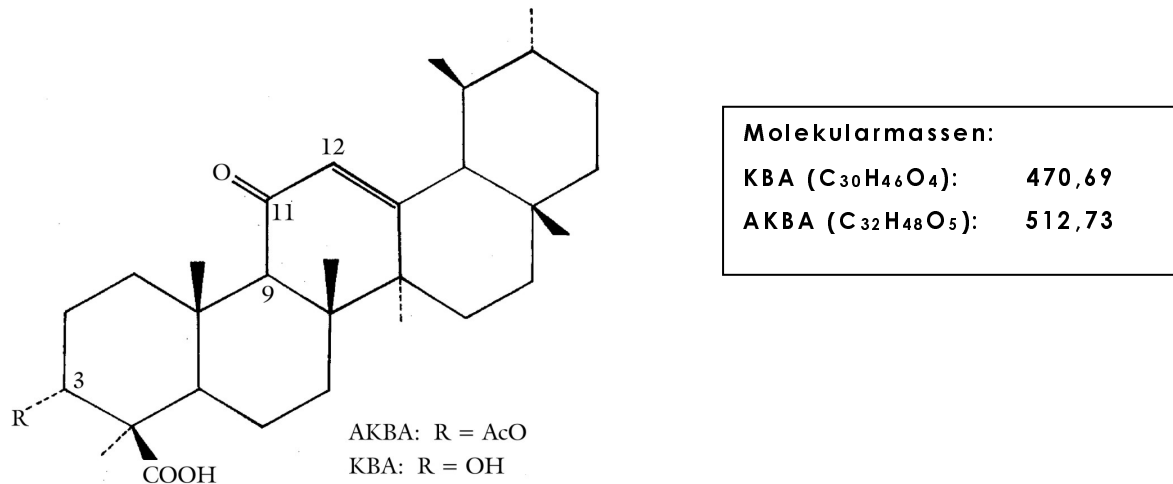


Abb.3: β -Boswelliasäuren, ihre Molekülstruktur und Molekularmassen

1.3.2. Pharmakologisches Wirkprinzip der β -Boswelliasäuren

Sowohl "Weihrauch"-Extrakte als auch isolierte Boswelliasäuren als Reinsubstanzen wurden hinsichtlich ihrer pharmakologischen Wirksamkeit und den zugrunde liegenden Mechanismen untersucht. Hierbei konnten tierexperimentelle Ödem- und Arthritismodelle antiinflammatorische Effekte nachweisen (Singh, 1986; Sharma et al., 1989; Gupta et al., 1994).

Für die entzündungshemmende Aktivität von Weihrauchextrakt und reinen Boswelliasäuren fand sich ein identisches Wirkprinzip, so dass die Boswelliasäuren als die eigentlich pharmakologisch wirksamen Bestandteile des Pflanzenextraktes angesehen wurden. Weihrauch-Extrakt hatte durch eine Hemmung der Bildung von Leukotrien B_4 in myeloiden Zellen (Ammon et al., 1991) bereits auf den Wirkmechanismus von Boswelliasäuren hingewiesen, als

schließlich deren selektive Blockierung des Schlüsselenzyms der Leukotrienbiosynthese gezeigt werden konnte (Ammon et al., 1993). Schließlich fand sich ein bislang einzigartiges pharmakologisches Wirkmuster, denn die Boswelliasäuren zeigten die gleichzeitige Hemmung zweier Enzymaktivitäten (Safayhi et al., 1996), welche in zahlreichen entzündlichen Reaktionen eine bedeutsame pathophysiologische Rolle spielen. Boswelliasäuren blockieren das Schlüsselenzym der Leukotrien-Synthese, die 5-Lipoxygenase (Safayhi et al., 1992), und hemmen zudem die in polymorphkernigen Leukozyten produzierte humane Leukozytenelastase (HLE) (Safayhi et al., 1996).

Zusätzlich wurde als ein weiterer Teilaspekt bei der entzündungshemmenden, immunmodulatorischen Wirksamkeit von Boswelliasäuren der hemmende Einfluß auf die Komplementaktivierung beschrieben (Kapil und Moza, 1992).

1.3.3. Zytotoxische Aktivität von Weihrauch-Extrakt bzw. reinen Boswelliasäuren

Tierexperimentelle Untersuchungen mit einem Extrakt aus dem Gummiharz von *Boswellia serrata* erzielten Hinweise auf eine Proliferationshemmung bei Hirntumoren. Das Tumormodell an Ratten mit implantierten C6-Gliomen demonstrierte eine signifikant verlängerte Überlebenszeit der therapierten Tiere. Die Auswertung im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe post mortem ergab eine Reduktion des Tumorwachstums im Sinne von geringeren Tumorumfängen. Zudem konnte nach einer Therapiephase mit Weihrauch-Extrakt eine dosisabhängig gesteigerte Apoptoserate in den entnommenen und untersuchten Tumoren der Tiere nachgewiesen werden (Winking et al, 2000).

Eine cytotoxische Aktivität der im Weihrauch-Extrakt enthaltenen Boswelliasäuren konnte experimentell in unterschiedlichen Zellsystemen dokumentiert werden (Heldt et al., 1997; Shao et al., 1998; Huan et al., 2000). Für einige Lipoxxygenase-Hemmer wurde bekannt, daß sie in verschiedenen Zellsystemen den Zelltod induzieren können (Hörnlein et al., 1999). Der zelltoxische Effekt der Boswelliasäuren scheint dabei nicht von der Eigenschaft als Lipoxxygenase-Hemmer abhängig zu sein, denn es konnte gezeigt werden, dass AKBA auch bei Zellen, die keine Lipoxxygenase-mRNA exprimieren (HL60 und CCRF-CEM) zur Apoptose führt (Hoernlein et al., 1999; Shao et al., 1998). Mehrere Ergebnisse legten nahe, daß der Mechanismus dieser zelltoxischen Wirkung in einer Hemmung des Enzyms Topoisomerase besteht (Heldt et al., 1997; Hoernlein et al., 1999; Syrovets et al., 2000). Acetyl-Boswelliasäuren vermögen die Topoisomerase I und II α zu inhibieren, wobei als Wirkprinzip beschrieben wurde, daß die Triterpene mit DNA um die Bindung an das Enzym konkurrieren (Syrovets et al., 2000). Bemerkenswert in Hinblick auf die Behandlung von malignen Gliomen ist, dass Boswelliasäuren in vitro im mikromolaren Konzentrationsbereich den Zelltod in malignen Gliomzellen induzieren konnten, wobei den acetylierten Derivaten hier die größte Potenz zukam (Glaser et al., 1999). Für AKBA wurde speziell bei humanen Gliomzellen zudem ein verstärkender Effekt auf die cytotoxische Wirkung des Cytokins CD95-Ligand beschrieben (Glaser et al., 1999).

Aus den berichteten experimentellen Untersuchungen an verschiedenen Zelllinien lässt sich folgern, dass der cytotoxische Effekt von Boswelliasäuren nicht spezifisch auf Gliomzellen wirkt. Ein vorliegender Versuch mit Astrozyten neugeborener Ratten zeigte keine höhere Resistenz dieser Zellen gegenüber AKBA (Glaser et al., 1999). Da es sich in diesem Versuch um

teilungsaktive Zellen handelte, konnte nicht unmittelbar auf eine mögliche Neurotoxizität in vivo rückgeschlossen werden.

Aufgrund dieser vorliegenden Daten ist die Proliferationshemmung durch Boswelliasäuren bei malignen Gliomen ein interessanter Gegenstand einer Prüfung durch klinische Studien.

1.4. Maligne Gliome

1.4.1. Definition und Einteilung

Eine histogenetische Einteilung der Tumoren des zentralen Nervensystems wurde durch Bailey und Cushing bereits 1926 begründet (Bailey, 1926). Heute richtet sich die Artdiagnose dieser Tumoren nach der von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) herausgegebenen Klassifikation der Hirntumoren, welche im Jahr 2000 in ihrer dritten Auflage erschienen ist (Kleihues und Sobin, 2000). Das Graduierungssystem der WHO erlaubt eine orientierende prognostische Einschätzung der Tumorerkrankung (Tab.1), wobei die Einstufung in einen Malignitätsgrad von I-IV entsprechend den histologischen und zytologischen Kriterien zunehmender Anaplasie erfolgt.

Als Gliome werden alle hirneigenen Neoplasien, die von Zellen der Neuroglia ihren Ursprung nehmen, zusammengefasst (Greenberg, 2001). Unter den supratentoriellen Gliomen im Erwachsenenalter kommt den astrozytären, oligodendroglialen sowie den gemischten, oligoastrozytären Neoplasien des WHO-Grades II-IV die größte Bedeutung zu. Grad-II-Gliome werden häufig als niedrig maligne Gliome (low-grade-Glioma) angesprochen. Unter dem Begriff maligne Gliome sind Tumoren des WHO-Grades III und IV zu verstehen.

Tab.1: Mediane Überlebenszeit bei Hirntumoren in
Abhängigkeit vom WHO-Grad I-IV

WHO-Grad	Mediane Überlebenszeit
I	8-10J.
II	7-8J.
III	ca. 2J.
IV	<1J.

(Greenberg, 2001: S.400)

1.4.2. Epidemiologie

Angaben über die Häufigkeit von Neoplasien des zentralen Nervensystems variieren. Nach statistischen Schätzungen in den westlichen Ländern sind Hirntumoren mit einer Inzidenz von etwa 15 Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner im Jahr selten. Unter allen Tumorerkrankungen überhaupt besitzen die primären Hirntumoren etwa einen Anteil von 5% (Poeck, 1998).

Astrozytäre Tumoren bilden mit einem Anteil von etwa 40% die größte Untergruppe innerhalb der primären Hirntumoren. Ihre jährliche Inzidenz wird auf 4-5 Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner geschätzt (Poeck, 1998).

Das Glioblastom repräsentiert die häufigste maligne, hirneigene Geschwulst im Erwachsenenalter. Es tritt bevorzugt nach dem 50. Lebensjahr in Erscheinung und betrifft das männliche Geschlecht mit einem deutlich größeren Anteil (Poeck, 1998).

Lediglich 4-8% der Gliome stammen von oligodendroglialen Zellen ab, wobei Oligodendrogliome möglicherweise in ihrer Häufigkeit unterschätzt werden (Greenberg, 2001).

1.4.3. Klinik und Diagnostik maligner Gliome

Zeichen des erhöhten Hirndrucks können Initialsymptome eines malignen Glioms darstellen. Weitere Manifestationsformen der intrakraniellen Raumforderung sind neu auftretende fokale oder generalisierte Epilepsien oder neurologische Herdsymptome. Diagnoseverfahren der Wahl bei Verdacht auf einen Hirntumor ist die kraniale Kernspintomographie mit Kontrastmittelgabe.

Bei Nachweis einer intrakraniellen Raumforderung wird in aller Regel eine genaue Artdiagnose der Tumorerkrankung entweder auf dem Weg der operativen Tumorentfernung oder durch stereotaktische Biopsie angestrebt. Der stereotaktischen Biopsie wird bei ungünstig lokalisierten Läsionen oder bei multifokalen Herdbefunden sowie bei älteren Patienten in schlechtem Allgemeinzustand der Vorzug gegenüber der Operation gegeben (Ostertag et al. 1980, Hall 1998, Sawin et al. 1998).

1.4.4. Therapiestrategien bei malignen Gliomen

Primäre Therapiestrategie bei malignen Gliomen des WHO-Grades III und IV ist die mikrochirurgische Tumoresektion. Angestrebt wird die makroskopische Komplettresektion. Bei Tumoren mit Masseneffekt beseitigt die Operation die akute Gefahr der cerebralen Herniation, reduziert Hirndrucksymptome und kann zur Rückbildung von neurologischen Defiziten führen. Das Vermeiden von zusätzlichen neurologischen Ausfällen besitzt gegenüber der

Radikalität der Operation die höhere Priorität. Im Interesse der Funktionserhaltung kommen in der Gliomchirurgie Verfahren des Monitorings von funktionell wichtigen Hirnarealen sowie Methoden der Neuronavigation zur intraoperativen Tumorlokalisation zum Einsatz.

Einer mikrochirurgischen Tumorextirpation oder der bioptischen Diagnosesicherung folgt die Strahlentherapie der erweiterten Tumorregion. Obwohl Gliome eine mäßige Strahlenempfindlichkeit besitzen, verlängert die Radiatio die Überlebenszeit bei guter Lebensqualität. Gewöhnlich wird sie mit Dosierungen von 54-60 Gy fraktioniert appliziert (Weller, 2002).

Maligne astrozytäre Tumoren weisen eine geringe Chemosensitivität auf (DeAngelis, 2003). Außerhalb kontrollierter Studien wird eine adjuvante Chemotherapie insbesondere bei jüngeren Patienten mit günstigen prognostischen Faktoren und Patienten mit einem Karnofsky-Index von mindestens 70 eingesetzt. (De Angelis et al., 1998). Angewandte Therapieregime sind die Nitrosoharnstoffmonotherapie, die PCV-Chemotherapie (Levin et al., 1990; Cairncross et al., 1994), die Kombination aus ACNU und Teniposid (VM26) sowie Temozolomid (Yung et al., 1999). Der Einsatz der Chemotherapie zusätzlich zur Strahlentherapie verspricht eine Verlängerung der medianen Überlebenszeit um 2-3 Monate (Fine et al., 1993, Weller, 2003).

Im Unterschied zu den astrozytären Gliomen besitzt die Chemotherapie in der Behandlung von höhergradigen oligodendroglialen sowie oligoastrozytären Tumoren einen bedeutsamen Stellenwert. Diese Neoplasien sind deutlich chemosensitiver als die rein astrozytären Tumoren gleichen Malignitätsgrads (Cairncross et al., 1994). Als erste adjuvante Therapie nach der Tumorresektion wird bei anaplastischen Oligodendrogliomen und Oligoastrozytomen (WHO-Grad III) vor allem beim jüngeren Patienten zum Teil die Chemotherapie der

Strahlentherapie vorangestellt (Streffler et al., 2000). Die meisten Erfahrungen bestehen mit dem PCV-Schema. Der genaue Stellenwert von Chemotherapie oder Bestrahlung und der Kombination aus beidem wird derzeit in Studien untersucht (NOA-04-Studie, EORTC-Studie 26951).

Im Falle des Tumorrezidivs kann die Indikation zu einer erneuten Operation geprüft werden. Für einzelne Patienten mit umschriebenen Läsionen kommt auch eine erneute Strahlentherapie in Frage. In der Situation des Tumorrezidivs ist die Wirksamkeit einer Chemotherapie nach vorhergehender Radiotherapie besser belegt (Wong et al., 1999; Yung, 2000).

Neuere Ansätze in der Gliomtherapie umfassen Verfahren zur Angiogenesehemmung, Migrationshemmung und Invasionshemmung sowie Suizidgentherapie und Immuntherapie. Diese Methoden spielen nur in experimentell-klinischen Untersuchungen eine Rolle.

1.4.5. Biologisches Verhalten der Tumoren und ihre Prognose

Die Prognose ist für Patienten mit einem malignen Gliom ungünstig. Die Tumoren wachsen diffus und teilweise multilokulär. Maligne Gliome infiltrieren das Hirnparenchym über die makroskopisch oder in der Bildgebung sichtbaren Tumorgrenzen hinaus, selbst dann wenn sie abgegrenzt und umschrieben erscheinen. Die Empfindlichkeit und die funktionelle Differenzierung des Gehirns erlauben es nicht, den Tumor großzügig und mitsamt einer Sicherheitszone zu resektieren. Somit ist die operative Tumorentfernung nicht als kuratives Therapieverfahren einzustufen, denn stets verbleibende Tumorreste führen regelmäßig zum Auftreten eines vorwiegend lokalen Rezidivs. In Hinblick auf die Prognose unterscheiden sich

oligodendrogliale Tumoren von den astrozytären Geschwülsten. Auch bei Mischgliomen bedingt die oligodendrogliale Tumorkomponente im Vergleich zu rein astrozytären Tumoren gleicher Malignitätseinstufung eine höhere Überlebenszeit (Cairncross et al., 1994; Streffer et al., 2000).

Die Überlebenszeit hängt im Einzelfall von mehreren Einflußfaktoren ab. Schlechter Allgemeinzustand - beurteilt als Karnofsky-Index - und höheres Alter sind bei höhergradigen Gliomen als negative prädiktive Faktoren anerkannt (DeAngelis et al., 1998). Für das Glioblastom weisen die meisten Studien eine hohe Operationsradikalität als günstigen Prädiktor für die Überlebenszeit aus (Hess, 1999; Albert et al., 1994), wobei das Resektionsausmaß anhand der postoperativen Bildgebung beurteilt wird. Nicht alle Autoren teilen diese Auffassung über die Bedeutung der Operationsradikalität und sehen den Nutzen des chirurgischen Eingriffs vorwiegend in der Reduktion eines bedeutsamen Masseneffektes durch den Tumor. Bei den höhergradigen oligodendroglialen Tumoren wird das erreichte Ausmaß der Tumorentfernung in prognostischer Hinsicht allgemein als weniger entscheidend gewertet (Fortin et al., 1999).

1.5. Das peritumorale Hirnödem

1.5.1. Klinische Bedeutung und Therapieoptionen

Die malignen Gliome bilden in aller Regel ein deutliches peritumorales Ödem aus. Das fokale Ödem bedingt eine zusätzliche lokale raumfordernde Wirkung, welche für einen bedeutsamen Anteil der klinisch-neurologischen Beschwerdesymptomatik des Patienten verantwortlich ist. Durch medikamentöse antiödematöse Behandlung können neurologische Defizite reduziert werden.

Bei der medikamentösen Eindämmung des peritumoralen Ödems stellt Dexamethason das Mittel der Wahl dar. Es wird in der Akuttherapie der raumfordernden Hirnschwellung sowie zur Prophylaxe oder zur Reduktion des durch die operative Manipulation hervorgerufenen postoperativen Hirnödems eingesetzt. Die Behandlung mit Kortikosteroiden kann in Fällen eines ausgeprägten Hirnödems durch die zusätzliche Gabe von osmotisch wirksamen Substanzen wie Mannitol oder Glycerol unterstützt werden. Nach Beseitigung der Raumforderung und Rückbildung des Hirnödems wird ein rasches Ausschleichen der Steroide angestrebt. Zu Beginn einer Strahlentherapie wird eine Kortikosteroidtherapie in der Regel in niedrigerer Dosierung angesetzt (nach Weller,2002).

Kortikosteroide spielen zur antiödematösen Therapie eine bedeutende Rolle in der Behandlung maligner Gliome. Häufig ist – wie im Falle von Rest- oder Rezidivtumoren – eine Langzeittherapie mit Dexamethason notwendig. Eine solche Dauermedikation besitzt erhebliche Nebenwirkungen im Sinne des Symptomenkomplexes eines Cushing-Syndroms. Daher sind neue

alternative Wirkstoffe ohne gravierende Nebenwirkungen zum Ersatz oder zur Dosisersparung von Dexamethason höchst wünschenswert.

1.5.2. Faktoren der Pathogenese des peritumoralen Ödems

In Zusammenhang mit malignem Tumorwachstum entsteht vornehmlich ein Ödem vom vasogenen Typ. Die Ursache hierfür liegt in einer Störung der Blut-Hirn-Schranke, so dass unter diesen pathologischen Bedingungen Plasma-Bestandteile von niedrigem bis hohem Molekulargewicht die Hirnkapillaren verlassen und ins Hirngewebe übertreten können. Dies zieht einen Flüssigkeitseinstrom in den Extrazellulärraum nach sich (Schilling und Wahl, 1997).

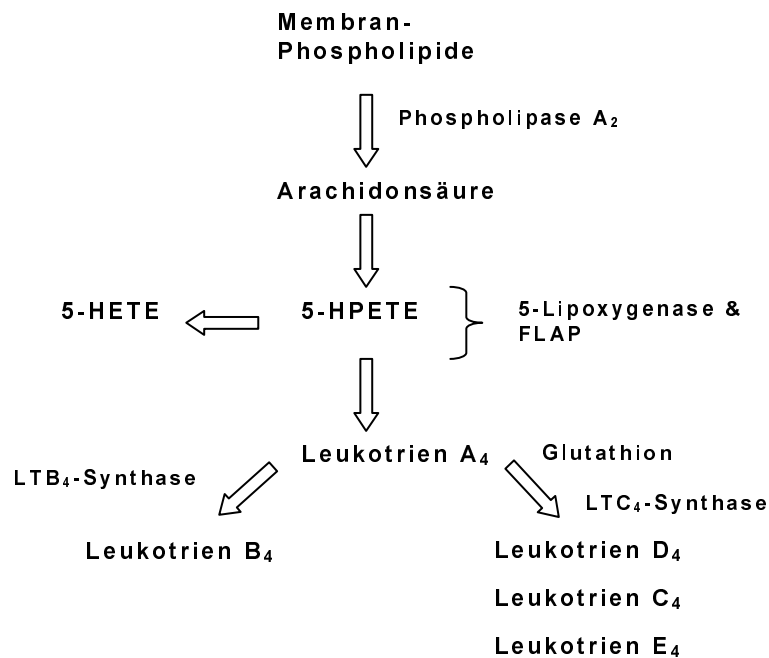
Die Durchlässigkeit von Hirnkapillaren ist durch die Blut-Hirn-Schranke diffizil geregelt und besonders geschützt. Die zellulären Mechanismen, welche zum Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke führen, sind sehr komplex. Eine entscheidende Rolle bei den pathophysiologischen Abläufen der Entwicklung eines vasogenen Hirnödems spielen Mediatoren, welche durch geschädigtes Hirngewebe bzw. durch Tumorgewebe freigesetzt werden. Die Komplexität des pathogenetischen Prozesses entsteht aus der Vielzahl an Mediatoren, welche in der Lage sind, die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke zu beeinflussen. Zu diesen Stoffen zählen Histamin, Bradykinin, Interleukine, Leukotriene und gemäß einiger Studien auch Serotonin. Zerebrale Endothelzellen besitzen Rezeptoren für die Nukleotide ATP, UTP und ADP, deren Aktivierung die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke steigert (Abbott, 1991; Abbott, 2000). Ein weiterer Kandidat der Mediatoren des Hirnödems ist VEGF, das nicht nur die Angiogenese beeinflusst, sondern zudem die Permeabilität des Kapillarendothels steigert

(Bitzer et al., 1998). Eine zusätzliche Rolle spielen wahrscheinlich freie Radikale, einschließlich NO (Imaizumi et al., 1996; Yasuma et al., 1997; Schilling und Wahl, 1999). Auch der Arachidonsäure wurde eine permeabilitätssteigernde Wirkung zugeschrieben (Unterberg et al., 1987). Möglicherweise ist die Wirkung der Arachidonsäure aber auch nicht zu trennen von der ihrer Metabolite, einerseits den Prostaglandinen und auf der anderen Seite den Leukotrienen (Abbott, 2000).

1.5.3. Leukotriene und ihre Rolle bei der Ödementstehung

Leukotriene sind Abkömmlinge der Arachidonsäure. Aus ungesättigten langkettigen C₂₀-Fettsäuren, die in großen Mengen in Phospholipiden von Zellmembranen vorkommen wird über die Phospholipase A₂ die Arachidonsäure gebildet. Wie aus dem Diagramm (Abb.4) ersichtlich, entstehen über den 5-Lipoxygenase-Weg die Leukotriene. Durch die 5-Lipoxygenase wird zunächst das instabile Leukotrien A₄ (LTA₄) synthetisiert, welches entweder enzymatisch zu dem stark chemotaktischen Faktor LTB₄ hydrolysiert oder glutathion-abhängig in die sogenannten Cysteinyl-Leukotriene LTC₄, LTD₄ und LTE₄ umgewandelt wird (Samuelsson, 1987 und 2000, Peters-Golden, 1998). Die Arachidonsäure ist zugleich Ausgangssubstrat für die Bildung von Prostaglandinen, von Prostacyclin und Thromboxan A₂, deren Synthese über den Cyclooxygenase-Weg abläuft.

Biosynthese der Leukotriene:



LT = Leukotrien

HETE = Hydroxytraensäure

HPETE = Hydroperoxy-eicosatetraensäure

FLAP = 5-Lipoxygenase-aktivierendes Protein

Abb. 4.: Biosynthese der Leukotriene aus Phospholipiden über das Ausgangssubstrat Arachidonsäure (Forth, 1996; S.339)

In vielen Geweben kommen Leukotriene in physiologischen Konzentrationen vor. Als Mediatoren sind sie in vielfältiger Weise an den pathophysiologischen Vorgängen von Entzündung oder Allergie beteiligt: Sie steuern Zelladhäsion und Chemotaxis, wirken bronchokonstriktorisch und beeinflussen die Vasopermeabilität (Samuelsson, 1981 und 1983). Die Eigenschaft, die Gefäßpermeabilität in der Endstrombahn zu steigern, macht

Leukotriene auch zu potentiellen Mediatoren des vasogenen Hirnödems.

In weißer und grauer Hirnsubstanz werden Leukotriene physiologischerweise produziert (Simmet et al, 1989 und 1990; Seregi et al., 1990). Unter pathologischen Bedingungen wie Ischämie, Trauma, Hämorrhagien sowie bei zerebralen Tumorerkrankungen ließ sich eine gesteigerte Leukotriensynthese nachweisen (Black et al., 1986; Kiwak et al., 1985; Winking et al., 1996; Winking et al, 1998; Simmet et al, 1990). Das Auftreten von Leukotrienen in erhöhten Konzentrationen allein scheint nicht ausreichend zu sein, die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke zu erhöhen. So konnten experimentelle Ergebnisse belegen, dass im gesunden Gehirn die Applikation von Peptidoleukotrienen über die Blutstrombahn oder direkt ins Hirngewebe keine signifikante Öffnung der Blut-Hirn-Schranke bewirkt (Black et al, 1990; Chio et al, 1992). Anders sieht dies unter pathologischen Bedingungen aus, wenn die Funktion der Blut-Hirn-Schranke gestört ist. Es konnte gezeigt werden, dass im Bereich von malignen Hirntumoren Leukotriene selektiv die Permeabilität der Blut- Hirn- Schranke erhöhen (Black et al., 1990; Chio et al., 1992). Auch im ischämischen Gewebe wurde bei Ratten eine selektive Zunahme der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke durch LTC₄-Infusion demonstriert (Baba et al., 1991). In einer Studie an Patienten, welche an einem malignen Gliom operiert wurden, konnte eine signifikante Korrelation gezeigt werden zwischen der Leukotrien-Bildung (LTC₄) in Tumorgewebeschnitten und dem Ausmaß des peritumoralen Ödems. Die Ausprägung des fokalen Ödems wurde präoperativ durch den Ödem-Tumor-Index in einer amgefertigten Kernspintomographie beurteilt (Black et al., 1986, Simmet et al., 1990). Für die ödemfördernde Wirkung der Leukotriene unter pathophysiologischen Bedingungen wurde eine gestörte Enzymfunktion der Hirnkapillaren im Tumorgebiet bzw. im

ischämisch geschädigten Gewebe verantwortlich gemacht. Denn in gesunden Hirnkapillaren sind dort vorhandene Enzyme wie γ -Glutamyltranspeptidase (Y-GTP) und Aminodipeptidase in der Lage, Leukotriene zu inaktivieren (DeBault, 1981; Keppler, 1989; Black et al., 1994). Es konnte nachgewiesen werden, dass im Bereich von malignen Gliomen die Y-GTP fehlt, wodurch die enzymatische Inaktivierung der Leukotriene reduziert ist (Black et al., 1990; Baba et al., 1991). Die Folge ist eine lokale Steigerung der cerebralen Vasopermeabilität und die fokale Ödementstehung.

Die vorgestellten experimentellen Ergebnisse weisen den Leukotrienen somit eine pathogenetisch bedeutsame Rolle bei der Entstehung eines peritumoralen Hirnödems zu.

1.5.4. Leukotrien-Inhibitoren als antiödematöse Therapeutika

Leukotriene stellen pathophysiologisch aktive Substanzen bei der Entstehung eines Hirnödems dar. Somit verspricht der Einsatz von Leukotrien-Inhibitoren die Möglichkeit einer medikamentösen Ödemreduktion. Die pharmakologische Wirkung von verschiedenen Leukotrien-Hemmern auf die Ausbildung eines Hirnödems wurde im Tiermodell unter den Bedingungen eines malignen Tumors sowie in der Situation einer induzierten Hirnischämie untersucht. Im Fall einer malignen Geschwulst konnte gezeigt werden, dass die eingesetzten Leukotrien-Hemmer die Gefäßpermeabilität im Tumor und im angrenzenden Gewebe, sprich im Bereich einer gestörten Funktion der Blut-Hirn-Schranke, reduzierten (Baba et al., 1992). Die antiödematöse Wirksamkeit von unterschiedlichen Leukotrien-Blockern konnte auch bei ischämisch bedingtem Hirnödem nachgewiesen werden. Eine Reihe von experimentellen Untersuchungen an Ischämie-

Reperfusions-Modellen demonstrierte eine effektive Verringerung des resultierenden Ödems (Moskowitz et al, 1984; Mabe et al., 1990; Baskaya et al., 1996; Namura et al., 1994; Andrus et al., 1994).

Bezüglich der Anwendung eines Leukotrieninhibitors beim Menschen liegen Ergebnisse über die Medikation mit Weihrauchextrakt vor. In einer klinischen Studie wurde an einer kleinen Gruppe von Glioblastom-Patienten unmittelbar die Auswirkung einer Behandlung mit Weihrauchextrakt (H15, 1200mg/die) auf die Größenausdehnung des perifokalen Hirnödems untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Medikation dosisabhängig eine signifikante Reduzierung des peritumoralen Ödems gemessen am Ödem-Tumor-Index hervorrief (Böker und Winking, 1997).

Insgesamt konnte die antiödematöse Wirksamkeit von Leukotrien-Inhibitoren bestätigt werden und der klinische Einsatz solcher Wirksubstanzen erscheint somit vielversprechend.

1.6. Problemstellung der eigenen Arbeit

Die eigene experimentelle Arbeit befasste sich mit der Etablierung von HPLC-Verfahren zur Detektion und Quantifizierung der beiden wichtigsten Vertreter der Boswelliasäuren, KBA und AKBA. In Hinblick auf pharmakokinetische Fragestellungen wurden biochemische Verfahrensweisen entwickelt, welche die beiden Boswelliasäuren in Blutproben sowie in Hirngewebe detektieren können. Zur Aufbereitung der biologischen Proben wurden verschiedene Ansätze verfolgt und deren Effektivität und Reliabilität beurteilt. Mit den gefundenen Nachweismethoden wurden Blutproben von freiwilligen Probanden analysiert, die ein handelsübliches Weihrauchpräparat (H15 Ayurmedica) oral eingenommen hatten. Im Tierversuch wurde Blut sowie Hirngewebe nach oraler und intravenöser Applikation der Reinsubstanzen KBA bzw. AKBA untersucht. Hierfür wurde eine Formulierung zur oralen sowie zur intravenösen Verabreichung entwickelt.

Die vorgestellten biochemischen Verfahrensweisen bilden eine Grundlage für die Untersuchung von pharmakokinetischen Eigenschaften der beiden Boswelliasäuren und sie können beispielsweise auch zur Standardisierung von pflanzlichen Weihrauchextrakten Anwendung finden.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien und biologische Materialien

AKBA stand als isolierte Trockensubstanz zur Verfügung (bereitgestellt durch ein Extraktionsverfahren von Prof Dr. J. Jauch, Institut für Organische Chemie und Biochemie der TU München). Acetonitril, Methanol, Ameisensäure sowie Chloroform vom Reinheitsgrad zur Flüssigkeitschromatographie wurden von der Firma Merck (Darmstadt, Dtl.) bezogen, Diethylether von Riedel de Haen (Seelze, Dtl.). Destilliertes Wasser wurde mit einem Milli-Q-Plus-System (Millipore, Bedford, USA) hergestellt.

Menschliches Vollblut wurde von mehreren freiwilligen Probanden gewonnen. Ein positives Votum der Ethikkommission des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität lag vor. Blutproben sowie Hirngewebe von Ratten stammten von getöteten Tieren, die im Rahmen tierexperimenteller Forschung am Physiologischen Institut der Universität Gießen zur Verfügung standen.

2.1.2. Labormaterialien und apparative Technik

Die Entnahme von Vollblut erfolgte mit handelsüblichen EDTA-K-Röhrchen (Kabevette®, KABE Labortechnik, Nümbrecht-Elsenroth,

Dtl.). Im Rahmen der Methodenentwicklung kam Humanserum (Nalgene®, PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich) zum Einsatz. Zur Probenaufbereitung wurden Zentrifugen-Röhrchen mit Schraubverschluß aus Polypropylen (Renner GmbH, Dannstadt, Dtl.) verwendet sowie Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml) (Eppendorf, Hamburg, Dtl.) und Fulcan Tubes (Cellstar®, Greiner bio-one, Frickenhausen, Dtl.). Das Lösen und Durchmischen von Proben erfolgte in einem Ultraschall-Bad (Sonorex TK 52, Bandelin MAGV GmbH, Rabenau-Londorf, Dtl.) und mit einem Vortex (Heidolph, Schwabach, Dtl.). Zur Extraktion wurden ein Eppendorf-Rotationsmischer (Eppendorf-Rotationsmischer 3300, Eppendorf, Hamburg, Dtl.) und ein Rotationsschüttler (IKA-Vibrax-VXR, Janke&Kunkel, Staufen, Dtl.) benutzt. Die eingesetzte Zentrifuge (Universal 32 R) stammte von der Firma Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, Dtl.).

Die Festphasenextraktion wurde mit Hilfe einer Vakuumkammer (IST Vac Master, Separtis GmbH, Grenzach-Wyhlen, Dtl.) durchgeführt. Die hierbei verwendeten Kartuschen waren C18-Säulen (Chromabond®, 1ml/100mg, Macherey-Nagel, Düren, Dtl.).

Die HPLC-Probengefäße waren Vials aus Polypropylen (Macherey-Nagel, Düren, Dtl.) sowie aus Klarglas (Qualyvials 1,5SR, Zinsser Analytik, Frankfurt/Main, Dtl.).

2.1.3. Instrumentarien zur HPLC und Massenspektrometrie

Zur Detektion der beiden Boswelliasäuren KBA und AKBA wurde ein konventionelles HPLC-Verfahren entwickelt. Dieses System diente zur Etablierung von Nachweismethoden für die beiden Boswelliasäuren KBA und AKBA aus Blut- und Gewebeproben. Zusätzlich wurde ein chromatographisches Trennverfahren für KBA und AKBA durch ein hochsensibles Nano-LC-System entwickelt,

dessen Messempfindlichkeit für Substanzmengen im Nanogramm-Bereich speziell geeignet ist.

Die konventionelle HPLC-Anlage setzte sich zusammen aus dem Autosampler 2157, der HPLC-Pumpe 2150, dem LC Controller 2152 und ein Lösungsmittel-aufbereiter der Firma Amersham Biosciences (Freiburg, Dtl.). Zur Detektion wurde der UV-Detektor 759A von Applied Biosystems verwendet. Zur Substanztrennung wurde eine C18-Säule (Macherey & Nagel, Nucleosil 100-5 C18 AB, 125 x 3 mm) eingesetzt, welcher eine Vorsäule der gleichen Firma mit identischem Füllmaterial (8 x 3 mm) vorgeschaltet war. Die Datenaufnahme erfolgte durch das Programm Eurochrom 2000 (Knauer, Berlin, Dtl.). Bei der konventionellen HPLC-Analytik wurde zur massenspektrometrischen Identifizierung von Peaks im UV-Chromatogramm ein MALDI-TOF-MS-System benutzt (Vision 2000, Bruker Daltonics, Bremen).

Das Nano-LC-System war ein Ultimate HPLC-System (LC-Packings, Amsterdam, Niederlande), in das der Autosampler Famos von LC-Packings integriert war. Zur Trennung der Boswelliasäuren wurde eine C-18 Säule (C-18-AB, Macherey & Nagel, 75 µm x 100 mm) verwendet.

Das System war direkt gekoppelt mit einem Esquire 3000 ESI-MS (Bruker, Daltonik, Bremen, Deutschland), welches im positiven Ionen-Modus arbeitete. Für die Elektrospray-Ionisation (1100-1700 V) wurden Kapillaren der Firma New Objective (Cambridge, USA) verwendet. Die Lösungsmittel wurden mit einem Stickstoff-Strom von 6l/min bei einer Temperatur von 150°C verflüchtigt. Registriert wurden Ionen im Bereich von 150-750 m/z.

2.2. Methoden

2.2.1. Verfahrensweisen bei der HPLC-Analytik

2.2.1.1. Systemeinstellungen der HPLC-Analytik

Zur Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (HPLC) wurden sowohl eine konventionelle HPLC-Anlage als auch ein hoch empfindliches Nano-HPLC-System eingesetzt. Bei beiden HPLC-Systemen wurde ein isokratisches Trennverfahren etabliert, d.h. die Elution erfolgte mit einem Lösungsmittel konstanter Zusammensetzung. Das Laufmittel A setzte sich zusammen aus 95 % aqua dest. und 5 % Acetonitril (v/v), das Laufmittel B beinhaltete 50 % Methanol, 36 % Acetonitril und 14 % aqua dest. (v/v/v). Alle Proben wurden zur HPLC-Analytik in wässrigem Acetonitril (50/50, v/v) aufgenommen. Die UV-Detektion fand für beide Boswelliasäuren bei der Wellenlänge 254 nm statt.

Bei der konventionellen HPLC-Anlage erfolgte die Trennung bei einer Flußrate von 1ml/min und Raumtemperatur. Die Laufmittel A und B wurden im Verhältnis von 12 zu 88 % konstant gehalten. Die Laufzeit betrug 20 min.

Bei dem Nano-LC-System wurde die Substanztrennung bei einer Flußrate von 130 nl/min und Raumtemperatur vollzogen, wobei die Laufmittel A und B im Verhältnis von 10:90 % eingesetzt wurden. Die Laufzeit wurde auf 25 min eingestellt. Nach jedem Lauf wurde die Injektionsnadel mit Isopropanol gespült.

2.2.1.2. Qualitätsicherung der Probenanalytik:

Generell wurde vor jeder Probenanalyse die störungsfreie Funktion des HPLC-Systems getestet. Definierte Mengen an KBA und AKBA wurden in wässrigem Acetonitril (50:50, v:v) gelöst und als Standardläufe in der HPLC analysiert. Zudem wurde eine "Leerprobe" injiziert, die reines Lösungsmittel (Acetonitril/Wasser, 50:50, v:v) beinhaltete.

In der Phase der Etablierung der HPLC-Verfahren wurde im Anschluss an Proben, welche die Substanzen KBA und AKBA beinhaltete HPLC-Läufe mit reinem Lösungsmittel ausgeführt, um Probenverschleppungen zwischen aufeinanderfolgenden HPLC-Läufen aufzudecken.

Bei der Testung von Extraktionsverfahren aus Blut- oder Gewebeproben wurde die Spezifität bzw. Reinheit der chromatographischen Peaks von KBA bzw. AKBA geprüft. Hierzu wurden Proben aufgearbeitet, welche frei von Boswelliasäuren waren. Die Ergebnisse dieser Proben dienten als Negativkontrollen und sie dienten dazu, eventuell vorhandene, störende Peaks im UV-Chromatogramm sichtbar zu machen.

Zusätzlich wurden die chromatographischen Peaks der Boswelliasäuren exemplarisch mittels Massenspektrometrie untersucht. Ziel dieser Verfahrenstechnik war, die Substanzen KBA bzw. AKBA anhand ihrer Molekularmassen zu identifizieren. Die charakteristische Größe Masse/Ladung (m/z) liegt für KBA bei 472 $[M+H]^+$, für AKBA beträgt m/z 514 $[M+H]^+$. Bei der Nano-HPLC-Anlage erfolgte eine massenspektrometrische Analyse des HPLC-Laufs unmittelbar durch Koppelung an ein ESI-MS-System. Um die chromatographischen Peaks von KBA bzw. AKBA im konventionellen HPLC-System mittels Massenspektrometrie zu untersuchen, wurde der HPLC-Lauf entsprechend der Peaks im UV-Chromatogramm fraktioniert, d.h. es wurde das Eluat der

detektierten Boswelliasäuren in kleinen Probengefäßen aufgefangen. Die gesammelten Proben wurden zur MALDI-TOF-MS-Analytik aufbereitet.

2.2.1.3. Quantifizierung von Boswelliasäuren mittels HPLC

Bei der HPLC-Analytik wird die Menge einer Substanz durch die Größe der Fläche repräsentiert, welche unter ihrem Peak im UV-Chromatogramm eingeschlossen ist. Die Berechnung der Fläche unter den chromatographischen Peaks der Boswelliasäuren erfolgte durch mathematische Integration und wurde durch das HPLC-System als automatische Rechenleistung ausgeführt.

Um Stoffmengen von KBA und AKBA mittels HPLC quantifizieren zu können, wurden Eichreihen mit bekannten Substanzmengen erstellt. Für verschiedene Stoffmengen wurde jeweils die resultierende Fläche unter den Peaks im UV-Chromatogramm bestimmt. Hierzu wurden im Falle der konventionellen HPLC-Analytik wiederholte Messungen mit 0,1 µg, 0,25 µg, 0,5 µg, 5 µg und 50 µg der beiden Boswelliasäuren durchgeführt. Bei der Nano-LC-Anlage wurden die Messpunkte 0,5 ng, 1 ng, 4,5 ng, 8 ng, 16 ng und 50 ng untersucht. Zugleich wurde geprüft, ob die Größe der Flächen unter den chromatographischen Peaks von KBA und AKBA mit steigender Stoffmenge linear zunahm. Bei nachgewiesener Linearität konnten Eichgeraden erstellt werden, welche jedem Flächeninhalt unter einem UV-Peak der Boswelliasäuren eine entsprechende Menge an KBA bzw. AKBA zuordnete.

2.2.2. Darstellung von KBA aus AKBA

Als Reinsubstanz stand zunächst nur AKBA in größeren Mengen zur Verfügung. Durch Abspaltung der Acetylgruppe wurde AKBA in KBA überführt. Der Prozeß der Deacetylierung wurde mittels 4 N methanolischem Ammoniak über 16 Stunden bei 100°C vollzogen. Das deacetylierte Produkt wurde massenspektrometrisch analysiert.

2.2.3. Stabilitätsprüfung der Boswelliasäuren

Die Stabilität von Boswelliasäuren in Lösung wurde untersucht. Beide Boswelliasäuren wurden im Probenlösungsmittel aus wässrigem Acetonitril (50:50, v/v) gelöst. Die Stammlösung, welche KBA und AKBA in einer Konzentration von 1 µg/µl enthielt, wurde um den Faktor 60 verdünnt, so daß sich eine Konzentration der Lösung von 17 ng/µl ergab. Zur Messung in der Nano-HPLC-Anlage wurden 30 µl in ein Probengefäß (Material: Polypropylen) gegeben. Diese Probe wurde über 24 Stunden bei 10°C im Autosampler der Anlage belassen. Jeweils 1 µl der Lösung wurde mit dreimaliger Wiederholung sofort nach der Probenherstellung sowie 8 und 24 Stunden später mittels HPLC analysiert. Im Zeitverlauf wurde im UV-Chromatogramm die Größe des Peaks von KBA und AKBA, sprich die detektierte Substanzmenge beider Boswelliasäuren, untersucht.

Anhand von sechs weiteren Proben wurde getestet, ob sich durch die Arbeitsschritte bei der Probenaufbereitung Hinweise auf Substanzverluste ergaben. Bei dieser Testung wurde nur eine Boswelliasäure (KBA) in einem Probengefäß in Lösung gegeben. Die eingesetzte Substanzmenge an KBA betrug 25 ng / µl gelöst in einem Volumen von 1 ml. Die ausgeführten Arbeitsschritte

bestanden im Durchmischen der Proben im Ultraschallbad (30 Sek.), in einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur sowie im Rütteln durch einen Rotationsschüttler über eine Zeitdauer von 15 min. Die Proben wurden anschließend mit dem Nano-HPLC-System analysiert. Dazu wurden von allen Proben 50 µl in HPLC-Vials (Polypropylen) überführt. Da die Proben bei verlustfreier Aufbereitung 25 ng KBA in 1 µl enthielten, wurde zum Vergleich eine Standard-Probe mit der Konzentration 25 ng / µl frisch angesetzt und ebenfalls analysiert.

Explorativ wurde das Material der verwendeten Probengefäße variiert. Es wurden die Materialien Polyethylen (Eppendorf-Reaktionsgefäß), Polypropylen (Zentrifugen-Röhrchen) und Glas (HPLC-Probengefäß) eingesetzt (n = 2). Die Proben wurden in der Reihenfolge "Polyethylen", "Glas" und "Polypropylen" mittels HPLC gemessen.

Gleichzeitig wurde explorativ untersucht, ob die Inkubation der lipophilen Boswelliasäure in einem hydrophilen Milieu (aqua dest.) Substanzverluste deutlich beeinflusste, beispielsweise durch raschere Adsorption an die Oberfläche des Probengefäßes. Bei drei Proben wurden 25 µg KBA direkt in 1 ml Probenlösungsmittel (Acetonitril / Wasser 50 : 50, v / v) gelöst. Dagegen wurde bei den anderen drei Proben die Menge von 25 µg KBA zunächst in 500 µl aqua dest. gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Erst dann wurde durch Zugabe von 500 µl die Zusammensetzung des Probenlösungsmittels (Acetonitril / Wasser 50 : 50, v / v) eingestellt.

2.2.4. Methodik zur Festphasenextraktion

Zur Aufreinigung von Proben, die bei der Aufbereitung von Humanserum oder der Aufarbeitung von organischem Gewebe

anfallen, wurde ein Verfahren zur Festphasenextraktion (SPE) entwickelt. Verschiedene SPE-Kartuschen wurden getestet, wobei sich C18-Säulen als geeignet erwiesen. Vor ihrer Aufbereitung durch Festphasenextraktion lagen die Proben gelöst in wässrigem Acetonitril (50/50, v/v) vor. Den Proben wurde vor ihrer Gabe auf die SPE-Säulen aqua dest. in einer Menge zugesetzt, dass sich ein Verhältnis von Wasser zu Acetonitril von 75/25 einstellte. Die Bindung von KBA und AKBA auf den Säulen wurde kontrolliert, indem sowohl der Durchlauf bei Probenaufnahme sowie die nachfolgende Waschfraktion mittels HPLC auf den Gehalt an Boswelliasäuren geprüft wurde.

Zur Elution wurden wässriges Acetonitril (50/50, v/v), reines Acetonitril, n-Hexan und ein Gemisch aus Chloroform und Methanol (50/50, v/v) erprobt. Das Gemisch aus Chloroform und Methanol (50/50, v/v) wurde als Eluens im Verfahren der Festphasenextraktion etabliert.

Zunächst wurden die C18-Säulen mit 5ml des Gemisches aus Chloroform und Methanol (50/50, v/v) gewaschen und durch Unterdruck wieder trocken gelegt. Zur Äquilibrierung wurden dann 3 ml wässrigen Acetonitrils (75/25, v/v) durch die Säulen gesogen. Die anschließende Probenaufnahme wurde mit sehr mildem Unterdruck ausgeführt, so dass die Probenflüssigkeit in einzelnen Tropfen aus den C18-Kartuschen wieder austrat. Die Säulen wurden weiterhin mit mildem Unterdruck mit 2 ml wässrigem Acetonitril (75/25, v/v) gewaschen und im Sog der Vakuumkammer über einige Sekunden trocken gelegt. Eluiert wurde tropfenweise mit 3 ml des Gemisches aus Chloroform und Methanol (50/50, v/v). Das Eluat wurde in einem Reagenzglas aufgefangen und anschließend im Stickstoff-Strom getrocknet. Zur Messung in der HPLC wurde die Probe mit Hilfe des Vortex sowie unter Einsatz des Ultraschall-Bades (5 min) in 1040 µl des Probenlösungsmittels (Acetonitril/Wasser 50/50, v/v) gelöst. Das

Injektionsvolumen zur HPLC-Analyse betrug 1000 µl. Das Lösen der Probe in 1040 µl des Probenlösungsmittels diente dem Zweck, das Ansaugen von Luft durch das HPLC-System zu vermeiden.

Zur Evaluation der Festphasenextraktion wurde die Wiederfindungsrate von eingesetzten Substanzmengen an KBA bzw. AKBA in der HPLC-Analytik bestimmt. Zusätzlich wurde überprüft, ob die Wiederfindungsrate für unterschiedliche Substanzmengen (0,1 µg, 0,25 µg, 0,5 µg und 1 µg KBA und AKBA, Versuchsreihe zweifach ausgeführt) konstant war.

2.2.5. Extraktion von Boswelliasäuren aus Vollblut

Es wurden verschiedene Ansätze zur Extraktion der Boswelliasäuren aus humanem Blut erprobt. Ein Volumen von 2 ml Blut wurde mit definierten Mengen an KBA und AKBA versetzt. Hierzu wurden die Reinsubstanzen KBA und AKBA in Methanol gelöst, so dass 1 µl der Lösung jeweils 1 µg der Substanzen enthielt. Entsprechende Mengen dieser Ausgangslösung wurden im Probenlösungsmittel so aufgenommen, dass immer ein Gesamtvolumen von 10 µl in die Proben appliziert wurde.

Die Extraktionsverfahren wurden anhand ihrer Wiederfindungsrate an Boswelliasäuren beurteilt. Die extrahierten Mengen an KBA und AKBA wurden mittels HPLC quantifiziert und zu dem Standardwerten der Eichkurven ins Verhältnis gesetzt.

Die Zuverlässigkeit der Verfahren wurde durch die Schwankungsbreite der Wiederfindungsrate abgeschätzt.

2.2.5.1. Extraktion der Boswelliasäuren aus Humanserum

Es wurde untersucht, wie effizient Boswelliasäuren aus Humanserum mittels Acetonitril extrahiert werden können.

Je 500 µl von handelsfertig hergestelltem Humanserum wurden in Zentrifugenröhrchen (Polypropylen) gegeben und mit definierten Mengen von KBA und AKBA versetzt. Für jede der Boswelliasäuren wurde einzeln eine Probenreihe mit 2,5 µg, 5 µg und 25 µg KBA bzw. AKBA in doppelter Ausführung getestet. Nach Zugabe der Boswelliasäuren wurden die Proben kurz im Vortex durchmischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 500 µl Acetonitril hinzugefügt. Die Proben wurden für 30 Sekunden in das Ultraschall-Bad gestellt und anschließend über 15 min im Rotationsschüttler kräftig gerüttelt. Hiernach wurden sie abzentrifugiert (15 min, 4000 U/min, 21°C). Der Überstand wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und nochmals kräftig zentrifugiert (15min, 14000 U/min, 21°C). Aus diesen Gefäßen wurde ein Volumen von 500 µl in HPLC-Vials übernommen. Die Probenmessung in der konventionellen HPLC erfolgte mit einem Injektionsvolumen von 100µl.

Parallel wurde mit identischer Verfahrensweise eine doppelte Probenreihe bearbeitet, bei der identische Boswelliasäurekonzentrationen in aqua dest. gegeben wurden.

Als dritte Probenreihe wurde Serum ohne Zusatz von Boswelliasäuren aufgearbeitet (n = 2) (Negativkontrolle).

2.2.5.2. Analytik von KBA und AKBA aus humanem Blut über den Weg der Serum-Extraktion

Nach Extraktion von KBA und AKBA aus handelsfertigem Humanserum, war der nächste Schritt, beide Boswelliasäuren in Vollblut zu geben und das Extraktionsverfahren nach Gewinnung des Serums aus den Blutproben auszuführen. Die Serumgewinnung aus den Vollblutproben erfolgte durch Abpipettieren des Überstandes nach Zentrifugieren .

Jeweils 2 ml EDTA-Blut wurden in Zentrifugenröhrchen gegeben. Das Blut wurde mit 5 µg (n = 4), 1 µg (n = 4), 400 ng (n = 3), 200 ng (n = 3) und 100 ng (n = 3) KBA bzw. AKBA versetzt. Die Blutproben wurden mit Hilfe des Vortex durchmischt und bei Raumtemperatur 15 min inkubiert.

Durch Zentrifugieren (5 min, 4000 U/min, 21°C) wurde die Zellfraktion abgetrennt. Das Serum konnte sodann als Überstand von den Proben abpipettiert werden. Es wurde je 1 ml Serum in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (2 ml) überführt.

Nach Zugabe von 1 ml Acetonitril wurden die Proben 15 min im Eppendorf-Rotationsmischer geschüttelt. Anschließend wurden sie abzentrifugiert (15min, 14000 U/min, 21°C) und der Überstand wurde in Zentrifugen-Röhrchen gefüllt.

Die Proben wurden mit 2 ml aqua dest. verdünnt, so dass sich ein Verhältnis von Wasser zu Acetonitril von 75:25 einstellte. Zur Aufreinigung der trübe imponierenden Proben wurde anschließend die oben beschriebene Festphasenextraktion durchgeführt.

Die HPLC-Analyse erfolgte mit einem Injektionsvolumen von 500 µl.

2.2.5.3. Analytik von KBA und AKBA aus Vollblut durch Ether-Extraktion

Zur Überprüfung des Extraktionsverfahrens wurde Blut mehrerer Probanden beiderlei Geschlechts verwendet. Jeweils 2 ml EDTA-Blut wurden in Zentrifugenröhrchen (Polypropylen) mit Schraubverschluß gefüllt. Es wurden die Substanzmengen 1 µg (n=5), 500 ng (n=3), 250 ng (n=3) und 100 ng (n=3) von KBA und AKBA den Blutproben zugesetzt. Mittels Vortex wurden die Proben durchmischt und bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubiert.

Anschließend wurden 4ml Diethylether zu dem Blut gegeben. Die Zentrifugenröhrchen wurden in horizontaler Lage in den

Rotatiosschüttler eingespannt. Die Extraktion der Blutproben durch das Lösungsmittel erfolgte über einen Zeitraum von 15 Minuten. Nach Zentrifugieren (4000 U/min, 10 min, 7°C) der Proben wurde die Etherphase abpipettiert und in ein weiteres Zentrifugenröhrchen überführt. Der Diethylether wurde unter Stickstoff verdampft. Im Ultraschall-Bad (5 Minuten) und mittels Vortex wurde die trockene Probe in 1040 µl wässrigen Acetonitrils (50:50, v/v) gelöst. Das Probenvolumen wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und zentrifugiert (14000 U/min, 10 min, 7°C). Der Überstand wurde in ein HPLC-Vial übernommen. Zur HPLC-Analytik wurde ein Probenvolumen von 1000 µl injiziert.

2.2.6. Extraktion der Boswelliasäuren aus Hirngewebe

Die direkt post mortem entnommenen Gehirne von insgesamt acht Ratten wurden in Fulcan Tubes gegeben und das Feuchtgewicht ermittelt.

In das Gewebe der frisch entnommenen Organe wurden definierte Mengen (1 µg und 2 µg) an KBA und AKBA eingebracht. Hierzu wurden beide Reinsubstanzen in 20 µl Methanol gelöst, und in beide Großhirnhemisphären wurden mit Hilfe einer Mikropipette jeweils 10 µl injiziert. Die Organe wurden 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Im Anschluss wurden sie über eine Zeit von etwa 30 Stunden lyophilisiert. Nach dieser Zeit war durch die Gefriertrocknungsanlage aus den Geweben jegliches Wasser unter Vakuum entzogen.

Vor der weiteren Aufarbeitung wurde das Trockengewicht der Hirne bestimmt. Zunächst wurden die Organe in einem Mörser aus Keramik fein zermahlen. Das Pulver wurde in Zentrifugenröhrchen gefüllt. Zur Extraktion wurden 5 ml wässrigen Acetonitrils (50/50,

v/v) hinzugegeben. Die Probenröhrchen wurden in horizontaler Lagerung über 30 min im Rotationsschüttler gerüttelt. Nach Zentrifugieren (15 min, 4000 U/min, 20°C) wurde der Überstand von je 4 ml der Proben in weitere Zentrifugenröhrchen übernommen.

Bei 5 Proben wurden von diesem Überstand 550 µl in ein HPLC-Vial überführt und ein Probenvolumen von 500 µl wurde direkt zur HPLC-Analytik injiziert.

Bei drei Proben wurde zu dem Überstand 4 ml aqua dest. hinzugegeben, so dass sich ein Verhältnis von Wasser zu Acetonitril von 75:25 einstellte. Anschließend wurde das beschriebene Verfahren zur Festphasenextraktion mittels C-18-Säulen ausgeführt. Nach dem Trocknen des Eluates wurden die Proben in 1040 µl Probenlösungsmittel aufgenommen, wobei zur HPLC-Analytik ein Probenvolumen von 1000 µl injiziert wurde.

2.2.7. Pharmakologische Aufbereitung zur Applikation der Boswelliasäuren im Tierexperiment

Zur Applikation der Reinsubstanzen KBA und AKBA im Tierversuch wurde eine Aufbereitungsform zur oralen und intravenösen Verabreichung der Arzneistoffe getestet. Zur Darreichung der Substanzen KBA und AKBA wurde ein lipophiler Lösungsvermittler gesucht, wobei die Wahl auf eine handelsübliche Lipidemulsion (Deltalipid®) fiel, welche zur parenteralen Ernährung in der Humanmedizin Anwendung findet. Probeweise wurden 0,5 ml der Lipidemulsion in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und 1 mg der reinen Trockensubstanz AKBA hinzugefügt. Die Probe wurde über 15 Minuten im Ultraschallbad inkubiert.

Zur Überprüfung der Löslichkeit der Boswelliasäure in der Lipidemulsion wurde die Lösung zunächst über 2 min zentrifugiert (14000 U/min, RT), um ungelöste Rückstände nachzuweisen.

Zusätzlich wurde die Emulsion durch ein schwarzes Mikrofilterpapier (Porengröße 4-7 μm) gesogen, um mögliche kristalloide Spuren der weißen Substanz als Rückstand abzubilden.

2.2.8. Extraktion von AKBA und KBA aus Weihrauchextrakt H15

Exemplarisch wurde ein Extraktionsverfahren aus dem Weihrauch-Extrakt H15 mit anschließender HPLC-Analytik der beiden Boswelliasäuren KBA und AKBA ausgeführt. Explorativ wurde Tablettenmaterial des Weihrauchextraktes H15 extrahiert. Ziel war es, die Größenordnung der enthaltenen Mengen an KBA und AKBA einzuschätzen, da das Präparat von Probanden zur Bestimmung der Blutspiegel von beiden Boswelliasäuren eingenommen werden sollte.

Es sollte eine mögliche analytische Verfahrenstechnik zur quantitativen Bestimmung der Wirksubstanzen KBA und AKBA in pflanzlichen Aufbereitungen aus *Boswellia serrata* dokumentieren. Die Extraktion erfolgte aus dem Pulver einer Tablette des Weihrauchpräparates H-15 Ayurvedica (Pharmasan, Freiburg) mittels wässrigem Acetonitril (50/50, v/v) zum Nachweis von KBA und AKBA.

Die Tablette wurde im Mörser zerrieben, das Pulver wurde in ein Zentrifugenröhrchen (Polypropylen) gefüllt und sein Gewicht bestimmt.

Zur Extraktion wurden 4 ml wässrigen Acetonitrils (50/50, v/v) zugegeben und das Gemisch wurde 15 min lang mit Hilfe eines Probenrüttlers geschüttelt. Die Probe wurde im Anschluß zentrifugiert (15 min, 4000 U/min, RT) und die flüssige Phase in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Nach nochmaligem

Zentrifugieren (15 min, 14000 U/min) wurden Probenvolumina von 100 µl zur HPLC-Analytik injiziert.

Zur massenspektrometrischen Identifizierung der Peaks von KBA und AKBA im UV-Chromatogramm wurde der HPLC- Trennlauf fraktioniert, wobei das Laufmittel während der Detektion der einzelnen Peaks in Eppendorf-Gefäßen aufgefangen wurde. Die Fraktionen wurden mittels MALDI-TOF-MS-Analytik untersucht.

Da das Extraktionsverfahren nur einen unbekannten Anteil der Boswelliasäuren aus dem zermörserten Tablettenmaterial extrahiert hatte, wurde in einem weiteren Versuch die Effizienz des Extraktionsverfahrens ermittelt. Die Wiederfindungsrate wurde bestimmt, indem eine definierte Menge an KBA bzw. AKBA zusätzlich in zermahlendes Tablettenmaterial eingebracht wurde. Dieses Tablettenmaterial wurde extrahiert und mittels HPLC analysiert. Es wurden die HPLC-Analysen aus markiertem Tablettenmaterial mit denen aus unverändertem Weihrauchpräparat verglichen. Die Differenz der Flächen unter den UV-Peaks von KBA und AKBA zwischen markierten und unveränderten Proben repräsentierte die zugegebene Stoffmenge an Boswelliasäuren. Die Wiederfindungsrate des Extraktionsverfahrens aus H15-Tabletten errechnete sich aus dem Verhältnis von zugesetzter Substanzmenge im Tablettenmaterial und der entsprechend zusätzlich gemessenen Menge an Boswelliasäuren in der HPLC-Analytik.

Es wurde erneut eine Tablette des Präparates im Mörser zermahlen. Von dem Pulver wurden vier Portionen zu je 20 mg in Zentrifugenröhrchen gefüllt. In zwei der Proben wurden 50 µg KBA (gelöst in 50 µl Methanol) hinzugegeben. Nach gründlichem Durchmischen mit Hilfe des Vortex wurden die beiden Proben im Stickstoffstrom wieder getrocknet.

Zur Extraktion des Tablettenpulvers wurden alle Proben mit 1 ml wässrigen Acetonitrils (50:50, v/v) versetzt. Sie wurden 15 min im Rotationsschüttler gerüttelt und anschließend zentrifugiert (15 min, 4000 U/min, 21°C). Der Überstand wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße übernommen und nochmals abzentrifugiert (15 min, 14000 U/min, 21°C). Aus der Lösung wurden 120 µl in ein Vial überführt und mittels HPLC analysiert (Injektionsvolumen 100 µl). Parallel wurden Standard-Proben mit 5 µg sowie mit 50 µg KBA mittels HPLC gemessen.

2.2.9. Anwendungen der Nachweisverfahren aus Blut und Hirngewebe

2.2.9.1. Blutuntersuchung bei Probanden nach Einnahme von H15

Bei vier freiwilligen Probanden wurden Blutuntersuchungen durchgeführt, um Blutspiegel der Boswelliasäuren KBA und AKBA nach oraler Einnahme von 1600 mg des Weihrauchextraktes H15 Ayurvedica zu bestimmen. Zudem wurden Blutproben von fünf Patienten mit malignen Gliomen analysiert, die regelmäßig ein Weihrauchpräparat einnahmen. Für diese Untersuchungen lag ein positives Votum der Ethikkommission des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität vor sowie eine Versicherung für Probanden und Patienten. Von den Probanden wurde vor der Einnahme der H15-Tabletten eine Blutprobe entnommen („Leerprobe“). Bei einem Probanden erfolgte im Anschluß eine Einzelmessung, wobei die Blutprobe eine Stunde nach der Tabletteneinnahme entnommen wurde. Von vier

Probanden wurde im Verlauf von vier bis fünf Stunden nach oraler Medikation mehrfach 2ml Blut entnommen.

Von den Patienten wurde regelmäßig eine Medikation mit einem Weihrauchpräparat in Form von drei bis vier Tagesdosen eingenommen. Die verwendeten Präparate sowie deren Dosierungen waren teilweise unterschiedlich (siehe Tab.3.10). Bei vier Patienten wurde eine erste Blutuntersuchung vor der ersten Tabletteneinnahme des Tages durchgeführt. Es folgten zwei Blutentnahmen eine und zwei Stunden nach der Einnahme der ersten Tagesdosis. Bei einem Patienten erfolgte dreimalig eine Blutuntersuchung, wobei die Blutproben im Rahmen von routinemäßigen Kontrolluntersuchungen an verschiedenen Tagen ohne bestimmten zeitlichen Zusammenhang zur Einnahme des Weihrauchpräparates entnommen wurden.

Alle Proben wurden mittels Ether-Extraktion zur HPLC-Analyse aufbereitet.

2.2.9.2. Applikation der Reinsubstanzen KBA und AKBA im Tierversuch

Die Verabreichung der reinen Arzneistoffe KBA und AKBA wurde im Tierversuch an zwei Wistar-Ratten vorgenommen. Ein positives Votum der Tierschutzkommission der Justus-Liebig-Universität Gießen lag vor.

Als Testdosis wurde eine Dosierung von 25 µg/g KG angestrebt. Bei einem Körpergewicht der Tiere von etwa 200 g wurde von beiden Boswelliasäuren je 5 mg eingesetzt. Da KBA in einem Substanzgemisch mit einem Restgehalt von 5 % AKBA vorlag, betrug die applizierte Dosis 4,7 mg KBA und 5,3 mg AKBA. Beide Boswelliasäuren wurden einem Tier oral, dem anderen intravenös appliziert. In beiden Fällen wurden die Substanzen gelöst in 0,5 ml

der Lipidemulsion Deltalipid® verabreicht. Zum Lösen wurde die Emulsion mit den abgewogenen Stoffmengen an KBA und AKBA in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und 15 min im Ultraschallbad inkubiert.

Die Verabreichung an die narkotisierten Tiere erfolgte mit Hilfe einer Magensonde beziehungsweise durch Punktion des retrobulbären Venenplexus mit einer feinen Kanüle über den medialen Augenwinkel.

Zur Untersuchung von Blut und Hirngewebe wurde das Tier mit intravenöser Applikation nach 30 Minuten, das Tier mit oraler Gabe nach einer Stunde getötet. Die Ratten wurden erneut narkotisiert, getötet und ausgeblutet. und getötet. Das gewonnene Blut wurde in heparinisierte Zentrifugenröhrchen gefüllt und umgehend mittels Ether-Extraktion aufgearbeitet. Die entnommenen Gehirne wurden entsprechend der beschriebenen Methodik gefriergetrocknet und mit 50%-igem Acetonitril extrahiert.

3. Ergebnisse

3.1. Qualitätssicherung von HPLC-Verfahren und Probenanalytik

Typische UV-Chromatogramme im konventionellen HPLC-System von KBA und AKBA mit einer Substanzmenge von jeweils 1 µg sowie 100 ng sind nachfolgend abgebildet (Abb.5). Es ist zu sehen, dass die Detektionsgrenze der Analytik deutlich unterhalb einer Menge von 100 ng der beiden Boswelliasäuren liegt.

Zudem sind im Folgenden UV-Chromatogramme der einzelnen Boswelliasäuren im Nano-HPLC-System mit Substanzmengen von 0,5 ng und 25 ng abgebildet. Im HPLC-Lauf von KBA ist jeweils ein kleiner Peak von AKBA sichtbar. Dieser Peak resultierte aus einem kleinen Anteil AKBA, welcher bei der Herstellung von KBA aus AKBA mittels Deacetylierung nicht in KBA überführt worden war. Jeder HPLC-Lauf wurde unmittelbar massenspektrometrisch mittels ESI-MS-Technik analysiert. Beide Boswelliasäuren KBA und AKBA wurden mit ihrer charakteristischen Größe Masse / Ladung (für KBA ist $m/z = 471$, für AKBA ist $m/z = 513$) detektiert (Abb. 6 und Abb.7).

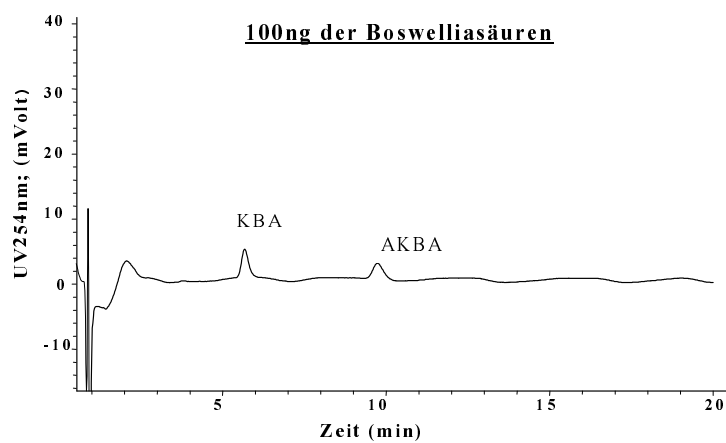
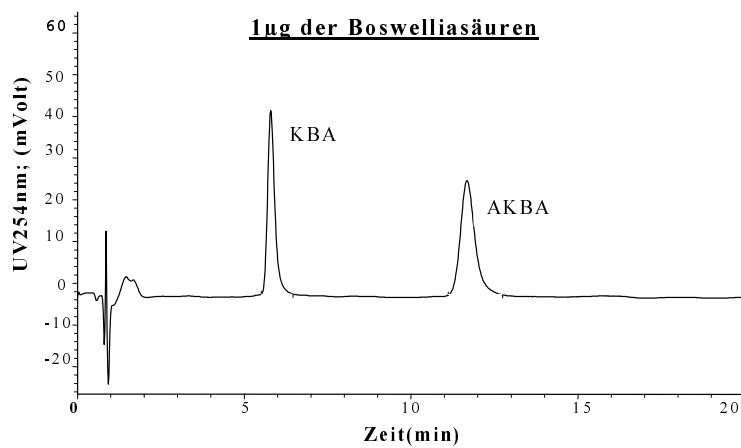
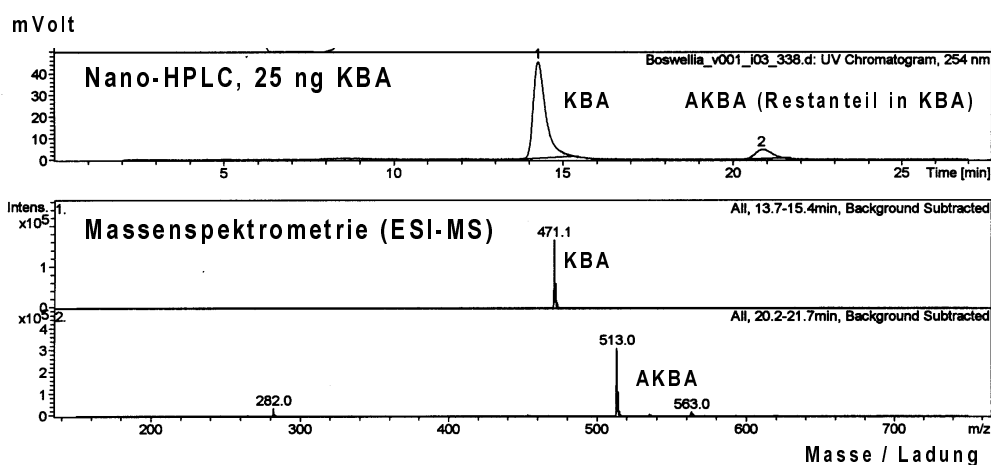


Abb.5: UV-Chromatogramme mit den Peaks von KBA und AKBA bei Substanzmengen von 1µg und 100ng; Detektion bei einer Wellenlänge von 254nm.

a)



b)

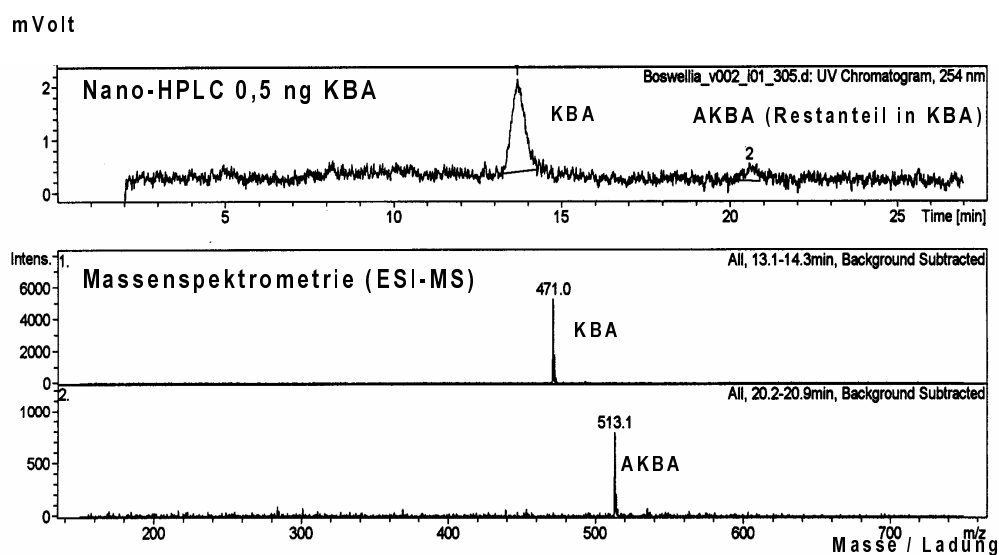
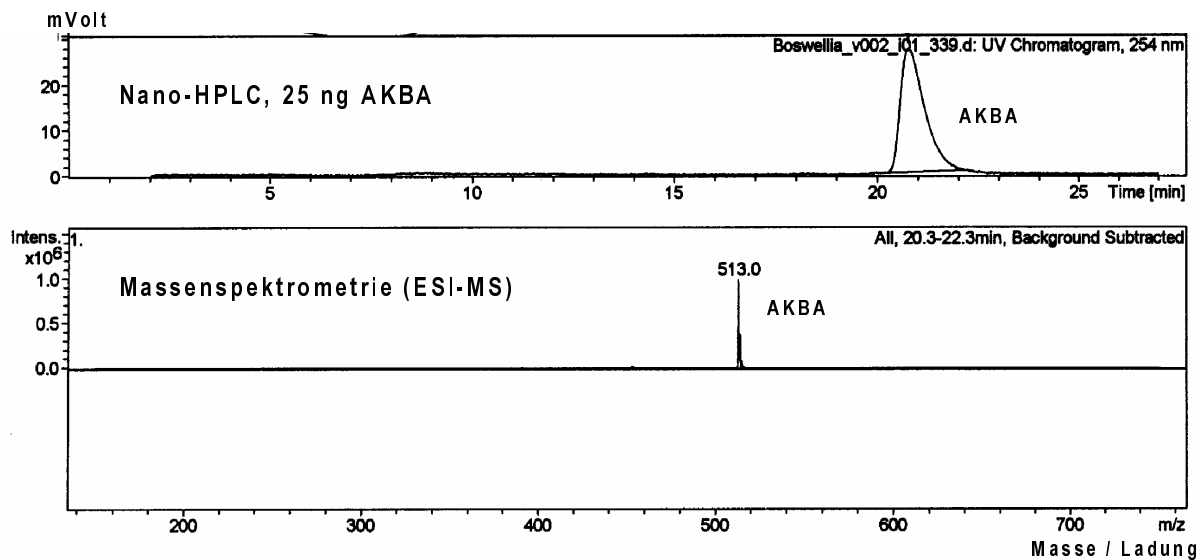


Abb. 6: UV-Chromatogramme von KBA bei Substanzmengen von 25ng (a) und 0,5ng (b); Detektion bei UV 254nm. Dabei herstellungsbedingt auch Nachweis von einem Restanteil an AKBA. Angekoppelte Massenspektrometrie (ESI-MS) mit Detektion der charakteristischen Größe m/z von KBA (471,0) und von AKBA (513,1).

a)



b)

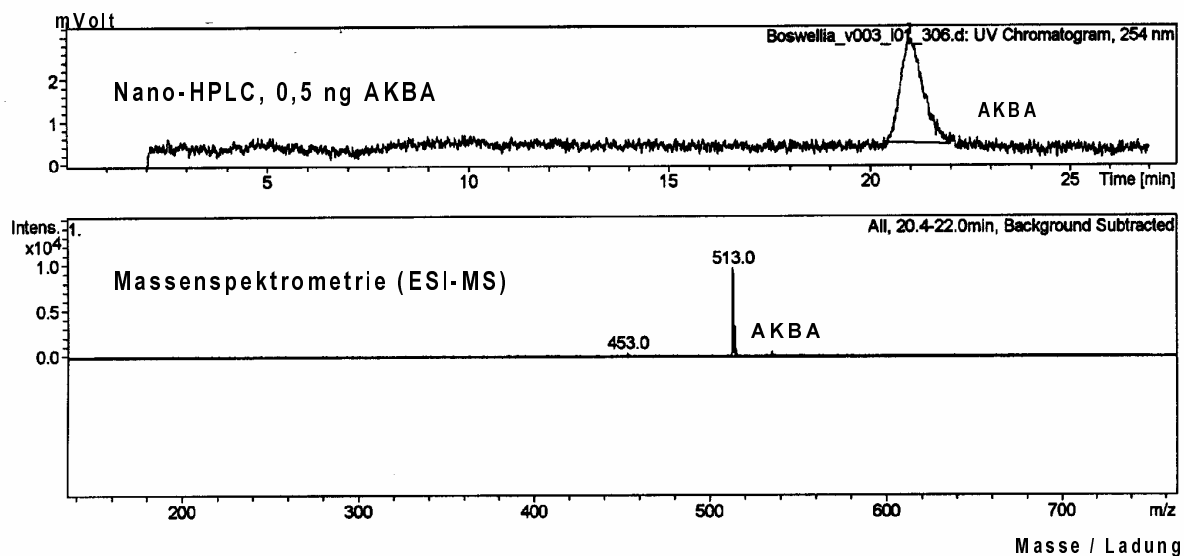


Abb.7: UV-Chromatogramme von AKBA bei Substanzmengen von 25ng (a) und 0,5ng (b); Detektion bei UV 254nm. Angekoppelte Massenspektrometrie (ESI-MS) mit Detektion der charakteristischen Größe m/z von AKBA (513,1).

Die Detektion von verschiedenen Substanzmengen an KBA und AKBA erfolgte im geprüften Bereich für beide HPLC-Systeme linear, wobei der Korrelationskoeffizient (r^2) im Mittel 0,99 betrug. Die Geraden wurden als Eichkurven zur Quantifizierung der Boswelliasäuren akzeptiert. Abgebildet ist jeweils die Eichgerade von KBA sowie AKBA in beiden HPLC-Systemen (Abb.8 und Abb.9)

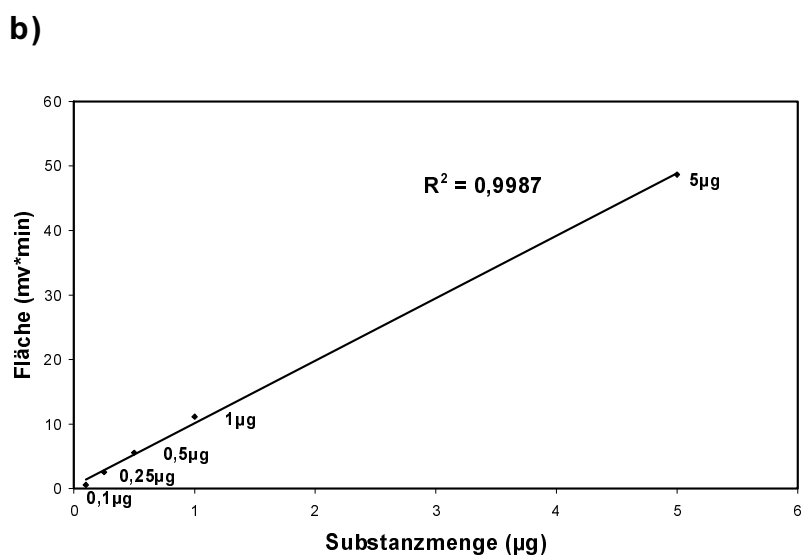
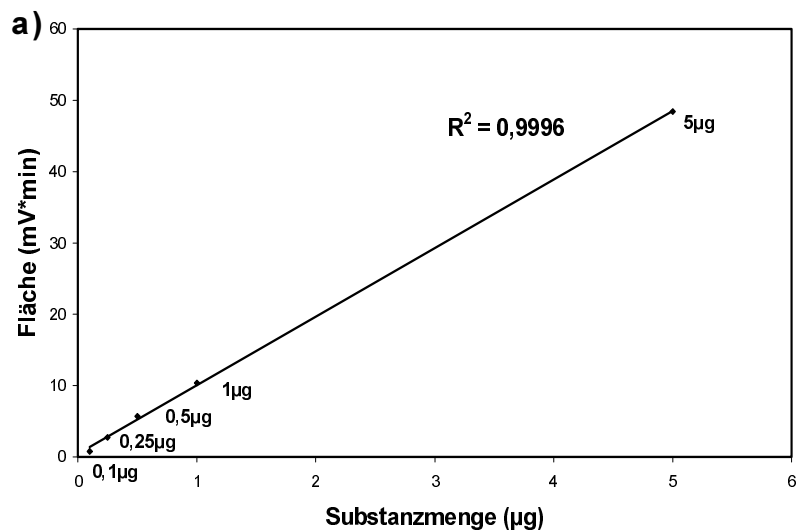
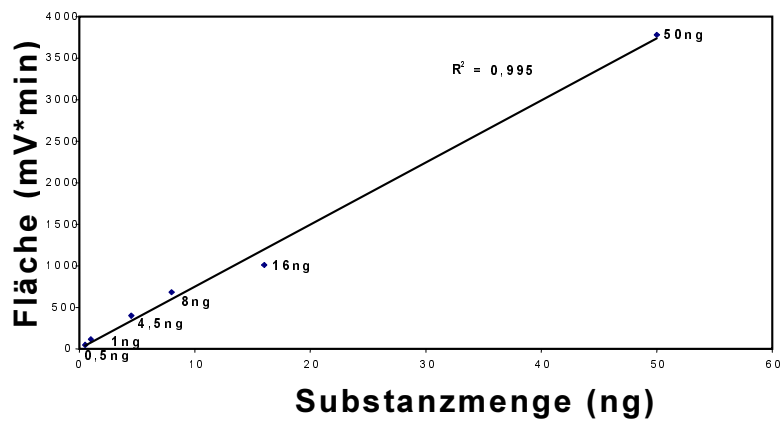


Abb.8: Eichreihe von KBA (a) und AKBA (b) (konventionelle HPLC). Lineare Abhängigkeit der eingesetzten Substanzmengen von KBA und AKBA und der gemessenen Größen der Peaks im UV-Chromatogramm, Korrelationskoeffizient (r^2) = 0,99

a)



b)

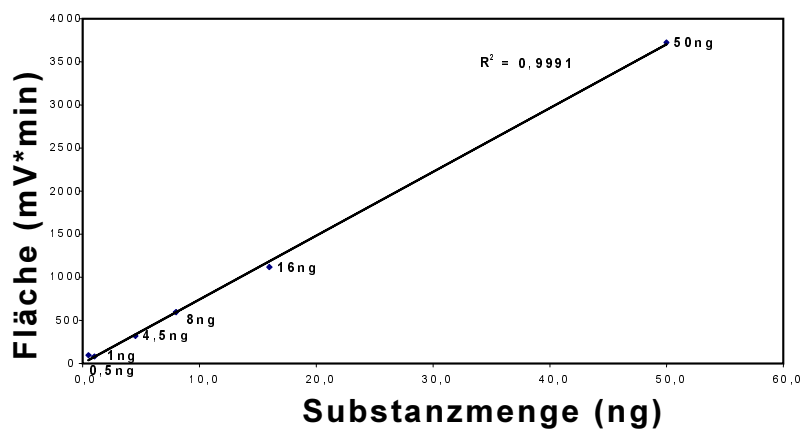


Abb.9: Eichreihe von KBA (a) und AKBA (b) (Nano-HPLC). Lineare Abhängigkeit der eingesetzten Substanzmengen an KBA und AKBA und der gemessenen Größen des Peaks im UV-Chromatogramm, Korrelationskoeffizient (r^2) = 0,99

Unter den verwendeten Bedingungen wurden Proben mit reinem Probenlösungsmittel im UV-Chromatogramm durch beide HPLC-Systeme als "leer" detektiert. Probenverschleppungen traten nicht auf.

3.2. Ausbeute an KBA durch Deacetylierung von AKBA

Durch das verwendete Verfahren ließen sich etwa 95 % der Ausgangssubstanz AKBA in KBA überführen. Das deacetylierte Produkt wurde massenspektrometrisch als KBA identifiziert. Nachfolgend abgebildet ist ein UV-Chromatogramm, das die Ausbeute an KBA darstellt (Abb.10).

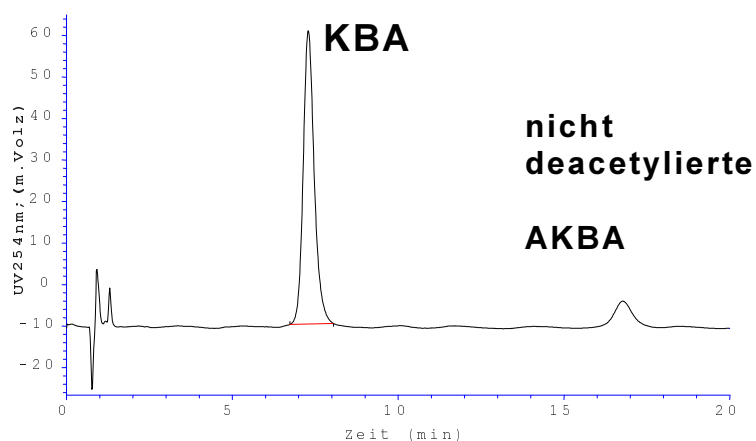


Abb.10: UV-Chromatogramm von KBA, welches aus AKBA durch Deacetylierung gewonnen wurde. Dabei wurden 95% von AKBA in KBA überführt, der Restanteil von AKBA beträgt 5%.

3.3. Stabilitätsprüfung der Boswelliasäuren

Wiederholte Injektionen zur HPLC-Analytik aus der gleichen Probe zeigten Substanzverluste an KBA und AKBA im Verlauf von 24 Stunden. Unter den Lagerungsbedingungen bei 10°C gingen bei der eingesetzten Ausgangskonzentration von 16 ng der beiden Boswelliasäuren etwa ein Drittel verloren (Abb.11)

Nach Abschluß der beschriebenen Aufbereitungsprozedur von Standard-Proben - Lagerung, Bearbeitung im Probenrüttler, Abfüllen des Probenvolumens in ein HPLC-Vial - wurden bei der Messung mittels HPLC Einbußen an Substanzmengen nachgewiesen (Abb.12). Die Aufbewahrung der Boswelliasäuren in hydrophiler Lösung für 15min zeigte hierbei keine Auswirkung.

Die Verluste an Boswelliasäuren während der Lagerung und der Probenaufarbeitung unterschieden sich in Abhängigkeit vom verwendeten Material der Probengefäße. Polypropylen und Glas wiesen ungefähr die gleichen Einbußen an KBA sowie AKBA auf, Polyethylen bewirkte im Vergleich deutlich höhere Substanzverluste (Abb.12).

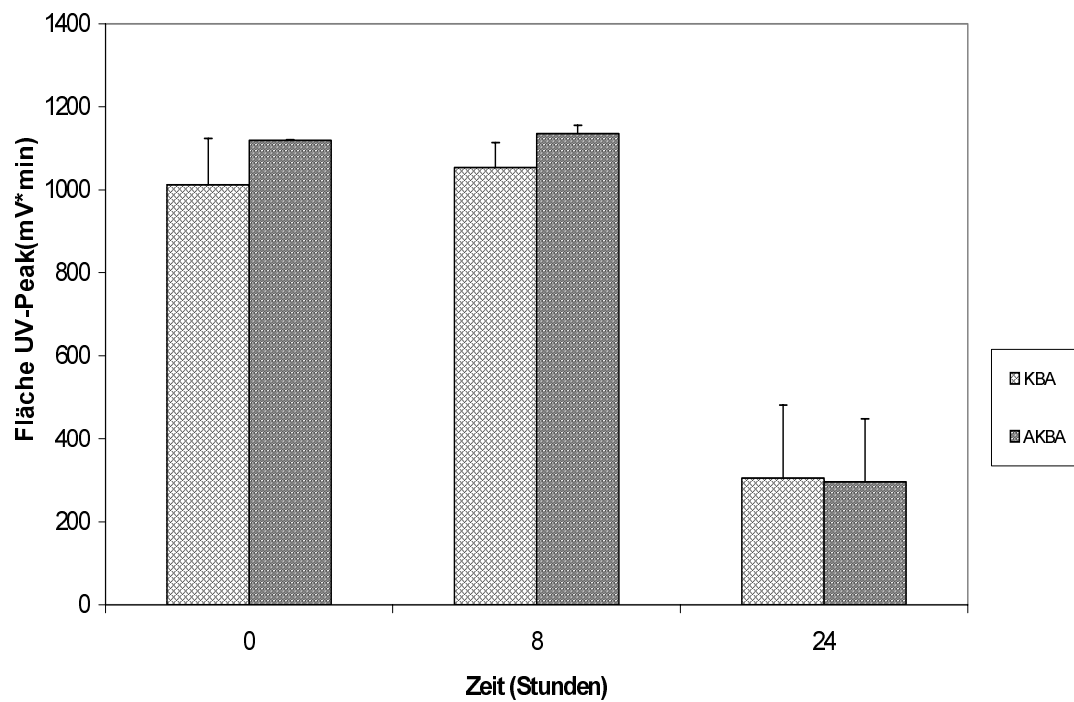


Abb.11: Substanzverluste von KBA und AKBA nach 8Std. und nach 24Std. Lagerung bei 10°C, gelöst in wässrigem Acetonitril (50:50, v/v)

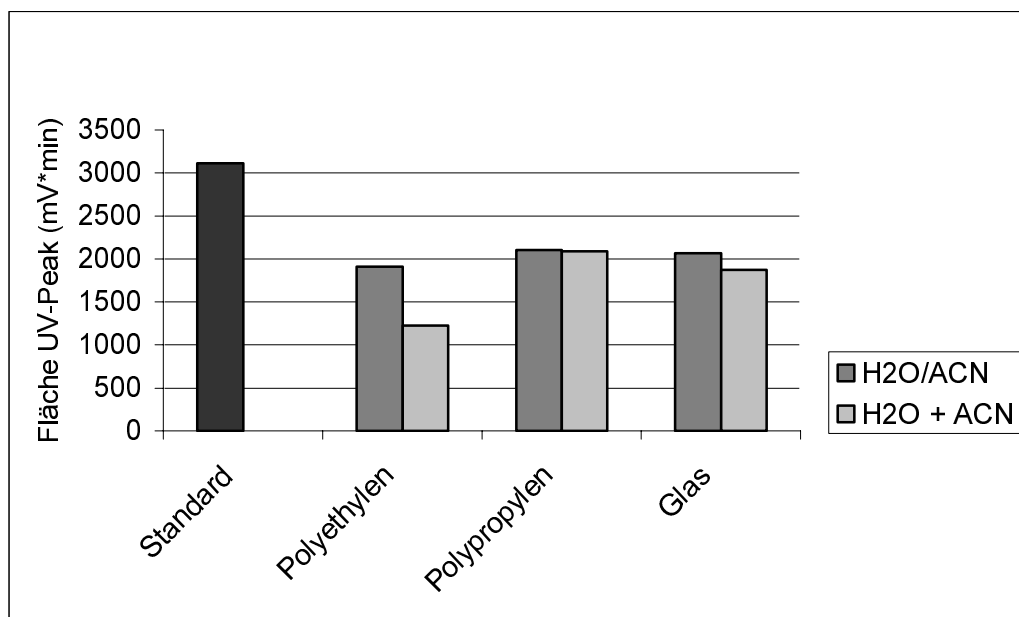


Abb.12: Substanzverluste von KBA bei Arbeitsschritten zur Probenaufbereitung in Abhängigkeit vom Material des Probengefäßes durch Adsorption an eingesetzte Materialien. In einer Probenreihe wurde KBA zunächst in aqua dest. gegeben und erst in einem späteren Schritt durch Zugabe von Acetonitril (ACN/ H₂O 50:50, v/v) eine lipophile Lösung eingestellt (H₂O/ACN); die zweite Probenreihe wurde von Beginn an in der lipophilen Lösung von wässrigem Acetonitril (50:50, v/v) aufgearbeitet (H₂O + ACN).

3.4. Evaluation des Verfahrens zur Festphasenextraktion

Bei dem eingesetzten Verfahren zur Festphasenextraktion zeigten Waschfraktion und Durchlauf in der HPLC-Analyse keinen Gehalt an Boswelliasäuren. Demnach konnte eine komplette und zuverlässige Bindung von AKBA und KBA auf den SPE-Säulen gezeigt werden.

Die Aufarbeitung von reinem Lösungsmittel ohne Boswelliasäuren durch Festphasenextraktion ergab als Negativkontrolle in der HPLC-Analytik ein UV-Chromatogramm ohne Peaks an den Positionen von KBA und AKBA. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass herausgelöste Substanzen aus dem Füllmaterial der SPE-Säulen in der HPLC-Analytik mit den Peaks der Boswelliasäuren interferieren. UV-Chromatogramme nach erfolgter Festphasenextraktion mit verschiedenen Konzentrationen der Boswelliasäuren sind nachfolgend abgebildet (Abb. 13).

Nach durchgeführter Festphasenextraktion betrug die quantitative Wiederfindungsrate der Boswelliasäuren in der HPLC-Analytik im Mittel 91 % für KBA (n = 8) und 78 % für AKBA (n = 8). Die Wiederfindung unterschied sich nicht in Abhängigkeit von der eingesetzten Stoffmenge (Tab.2).

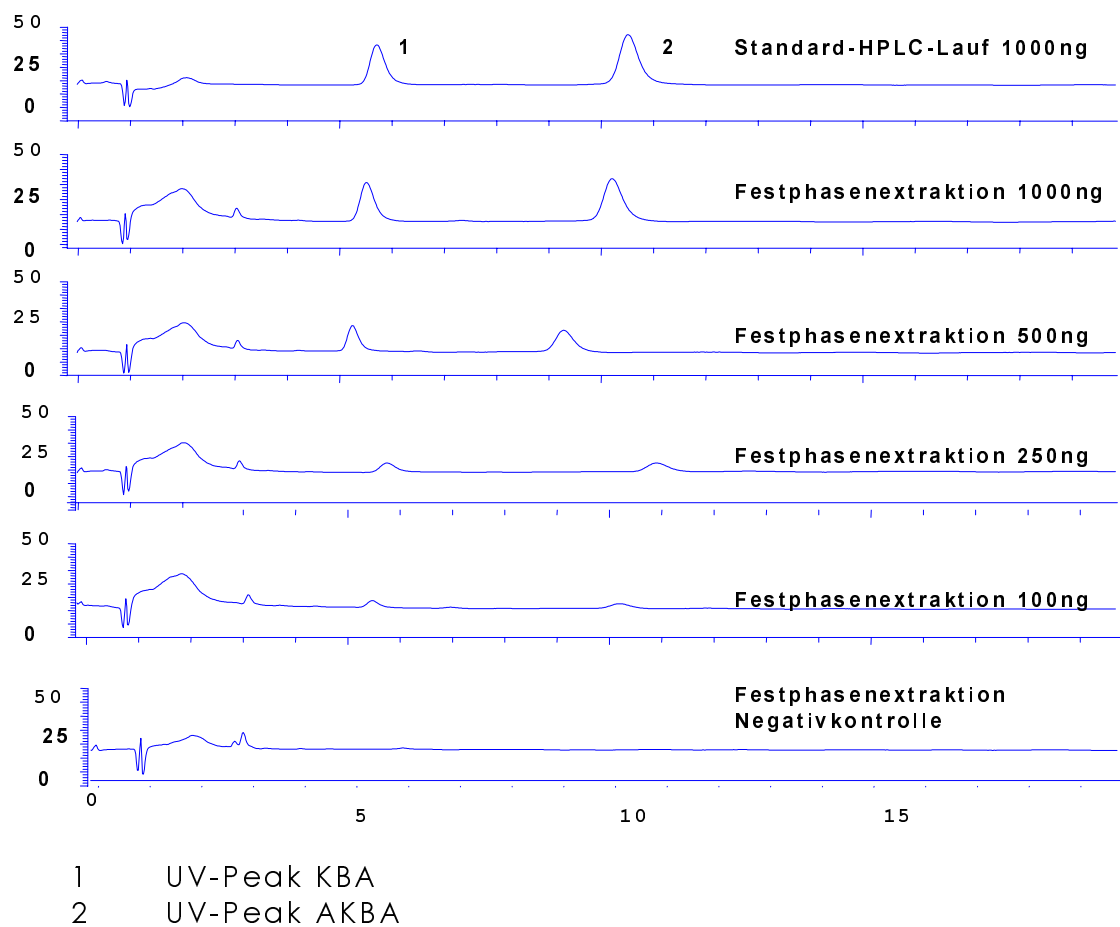


Abb. 13: UV-Chromatogramme von KBA und AKBA nach Durchführung der Festphasenextraktion mit verschiedenen Substanzmengen mit abgebildeter Negativkontrolle; (geringer Shift der UV-Peaks von KBA und AKBA aus technischen Gründen).

Tab. 3.1.: Wiederfindungsrate von KBA (a) und AKBA (b) nach Festphasenextraktion

a)

KBA	UV-Peaks [mV*min] Festphasen- extraktion	UV-Peaks [mV*min] Standard-Probe	Wiederfindungs- rate [%] aus 2ml Blut
1000 ng	9,7	10,2	95
	9,2		90
500 ng	4,7	5,1	92
	4,7		92
250 ng	2,5	2,6	96
	2,3		85
100 ng	1,2	1,3	92
	1,1		85
Mittelwert			91

b)

AKBA	UV-Peaks [mV*min] Festphasen- extraktion	UV-Peaks [mV*min] Standard-Probe	Wiederfindungs- rate [%] aus 2ml Blut
1000 ng	14,0	16,2	86
	13,8		85
500 ng	6,7	8,1	83
	7,2		89
250 ng	3,0	4,0	75
	3,1		78
100 ng	1,2	2,0	60
	1,4		70
Mittelwert			78

3.5. Effizienz der Nachweisverfahren aus Serum bzw. Vollblut

3.5.1. Extraktion der Boswelliasäuren aus humanem Serum

Durch das Extraktionsverfahren mittels Acetonitril aus handelsfertigem Humanemserum wurden durchschnittlich 85 % der zugegebenen Boswelliasäuren in der HPLC-Analytik detektiert (n = 6). Wurden die Boswelliasäuren mit dem gleichen Verfahren aus reinem Wasser extrahiert, ergab sich eine Wiederfindungsrate von 96 % (n = 6).

Die Schüttel-Extraktion einer Serumprobe ohne zugesetzte Boswelliasäuren zeigte im UV-Chromatogramm keine Peaks an der Position von KBA oder AKBA (n = 2).

Es wurde gezeigt, dass das Lösungsmittel Acetonitril in dem beschriebenen Mischungsverhältnis mit Serum geeignet war, um Boswelliasäuren aus humanem Serum zu extrahieren.

3.5.2. Analytik von KBA und AKBA aus Vollblut mittels Serumgewinnung

Beide Boswelliasäuren konnten mittels HPLC-Analytik detektiert werden, nachdem sie aus Blutproben über den Weg der Herstellung von Serum extrahiert wurden.

Die Wiederfindungsraten von KBA und AKBA durch das Extraktionsverfahren schwankten zwischen 14 % und 68 % (n = 17). Dieses Ergebnis zeigte die Notwendigkeit einer technischen Weiterentwicklung von Methoden zur Extraktion der Boswelliasäuren KBA und AKBA aus Vollblut auf.

3.5.3. Extraktion von KBA und AKBA aus Vollblut mittels Diethylether

Mit Hilfe von Diethylether konnten beide Boswelliasäuren aus Vollblut extrahiert werden.

Auch die niedrigste Stoffmenge von 100 ng KBA bzw. AKBA konnte mit dem Nachweisverfahren problemlos aus 2 ml Blut detektiert werden. Die Ether-Extraktionen aus nativem humanem Blut zeigten im UV-Chromatogramm eine reproduzierbare, identische Abfolge von Peaks. Diese Peaks interferierten nicht mit denen der Boswelliasäuren (Negativkontrollen) (Abb.14).

Die massenspektrometrische Identifizierung der Boswelliasäuren nach ihrer Extraktion aus 2 ml Blut wurde mit einer Menge von je 1 µg KBA und AKBA mittels MALDI-TOF-MS vorgenommen. Während der konventionellen HPLC-Analytik war das Eluat der UV-Peaks von KBA und AKBA zur massenspektrometrischen Untersuchung akquiriert worden (Fraktion 1 und 2). Die MALDI-TOF-Analytik ist nachfolgend abgebildet (Abb.15).

Bei den untersuchten Blutvolumina von 2ml lag die Wiederfindung von KBA bzw. AKBA durch das analytische Verfahren bei 57% (Standardabweichung 0,084) der Ausgangsmengen. Wurde die Effizienz des Extraktionsverfahrens getrennt für die beiden Boswelliasäuren berechnet, so ergab sich für KBA eine Wiederfindungsrate von 57 % (Standardabweichung 0,084), für AKBA lag die Ausbeute mit 56 % (Standardabweichung 0,086) knapp darunter. Bei der Berechnung der Wiederfindungsraten wurde das Ergebnis von einer Probe nicht berücksichtigt bei der sowohl KBA als auch AKBA nicht detektiert werden konnten. Möglicherweise war die Markierung der Probe mit KBA und AKBA unterblieben. Es fand sich kein Hinweis, dass die Ausbeute an Boswelliasäuren von den Konzentrationen der eingesetzten

Boswelliasäuren abhängig war. Eine Tabelle der Rohdaten aus den Testreihen der Extraktion aus Vollblut ist abgebildet (Tab.3 und Tab. 4)

Bei der Extraktion mit Diethylether konnten die Proben nach ihrer Aufbereitung ohne zusätzliche Festphasenextraktion in einem Volumen von 1000 µl zur HPLC-Analytik aufgegeben werden.

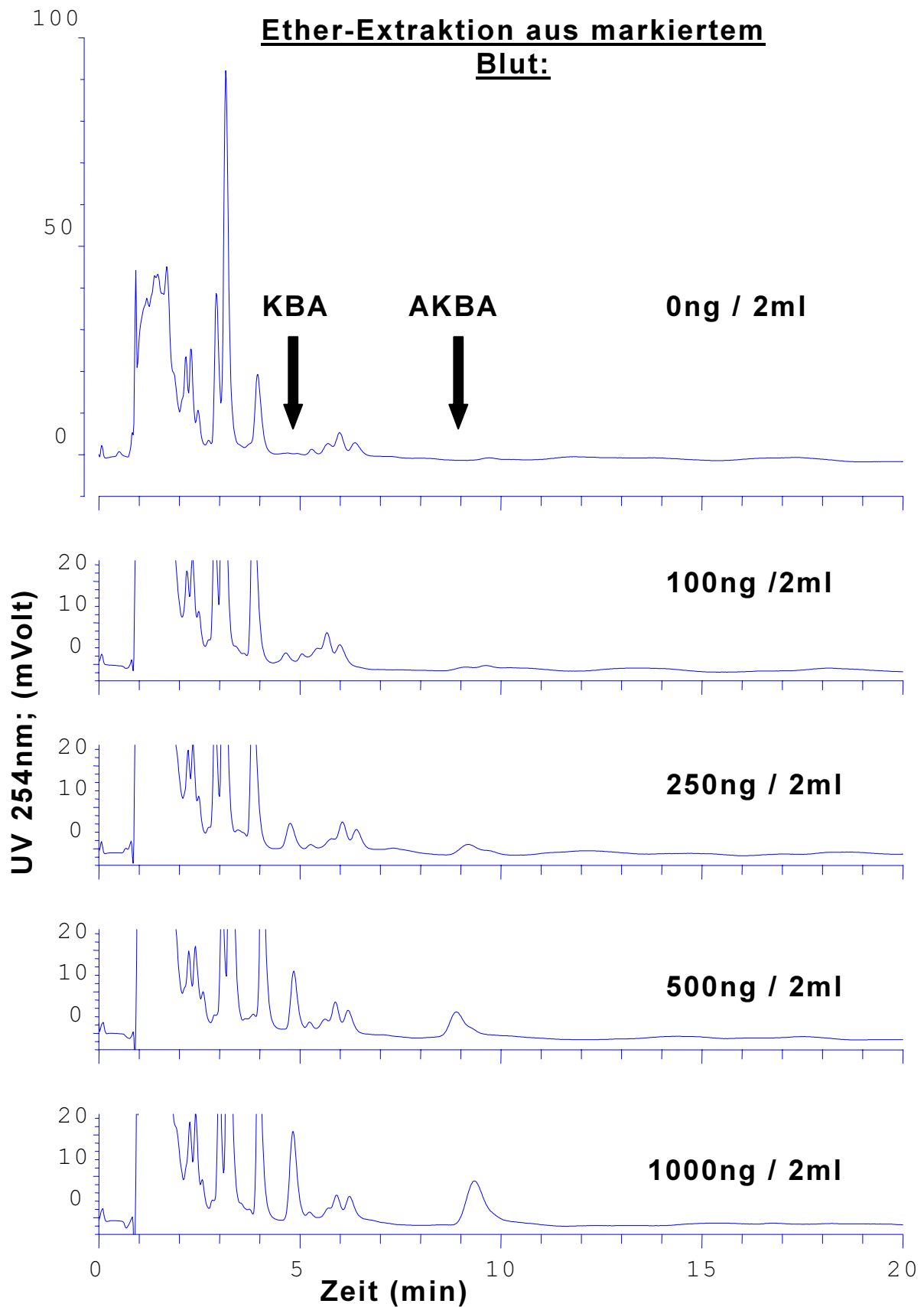


Abb.14: UV-Chromatogramme nach Extraktion aus markierten Blutproben mit den Peaks von KBA und AKBA, (geringer Shift der Peaks aus verfahrenstechnischen Gründen).

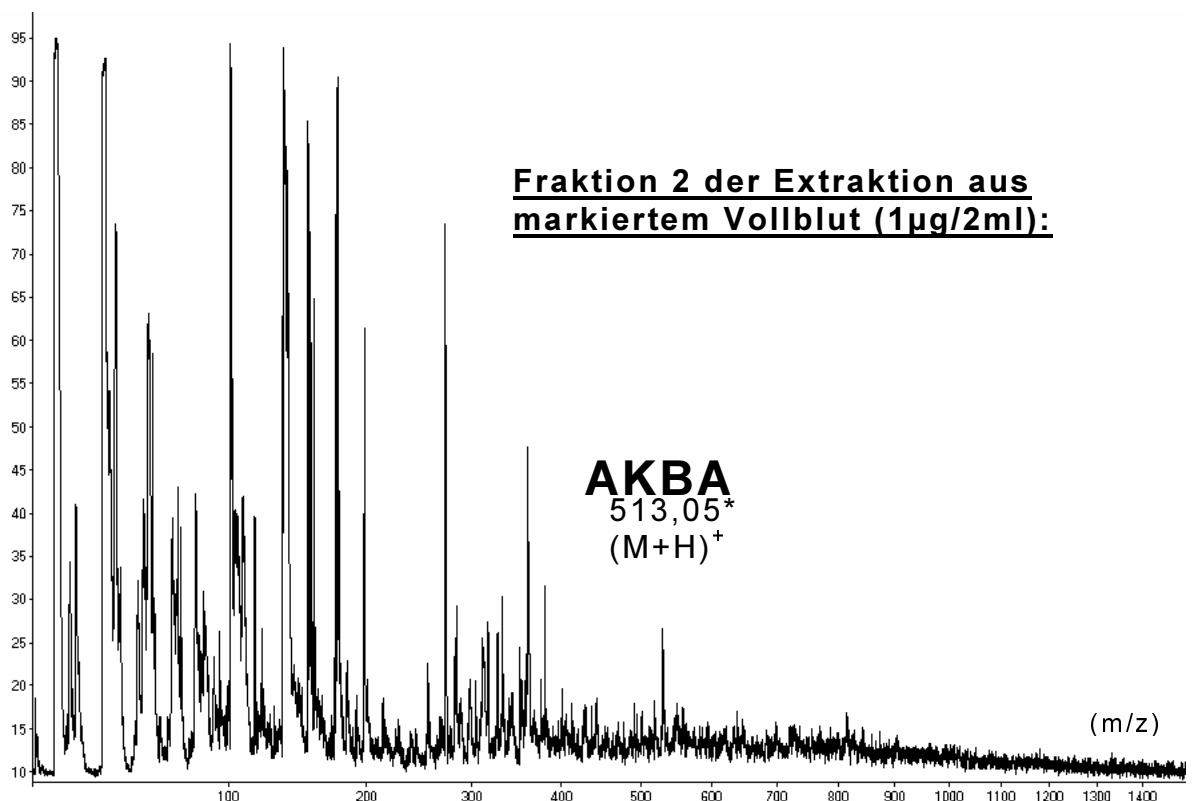
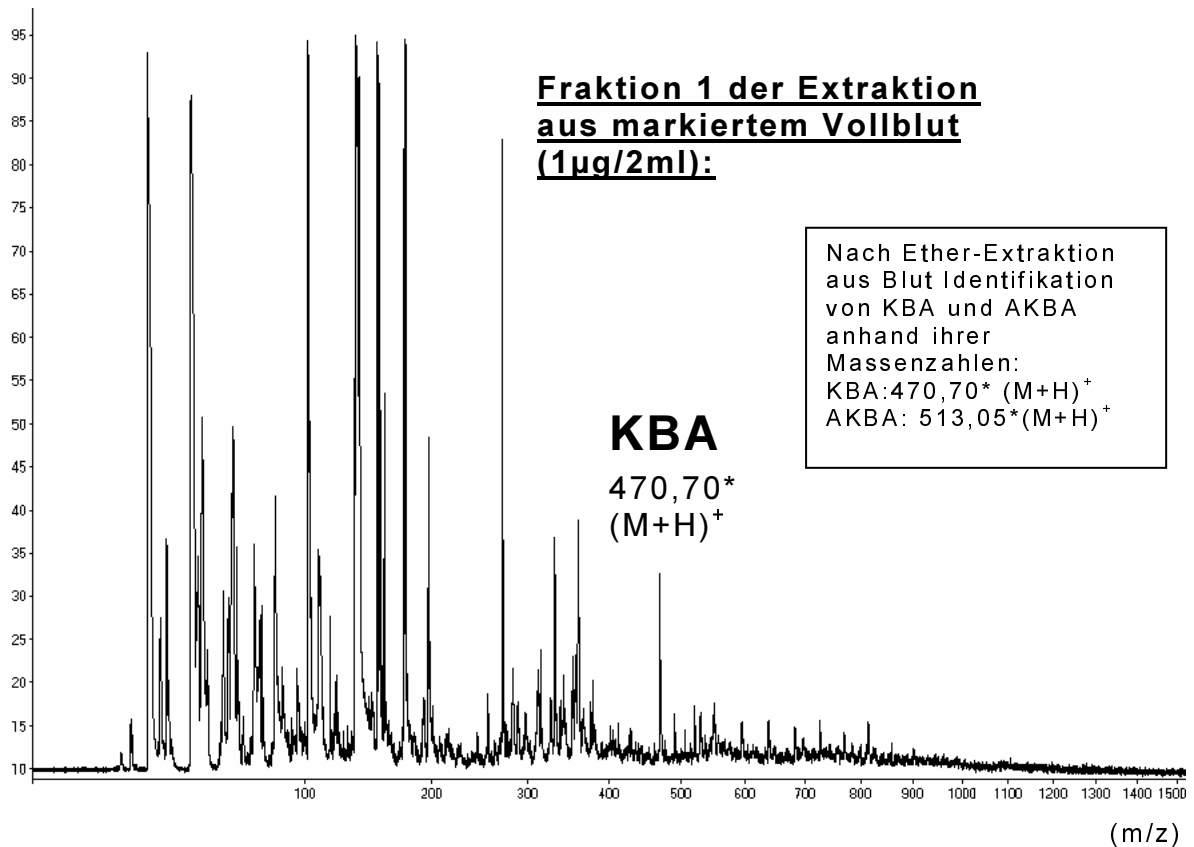


Abb.15: Massenspektrometrische Identifikation von KBA und AKBA nach Extraktion aus markiertem Blut (1µg/2ml)

Tab.3 : Wiederfindungsraten von KBA (a) und AKBA (b) nach Ether-Extraktion aus 2 ml Blut

a)

KBA	UV-Peaks [mV*min] Etherextraktion aus 2 ml Blut	UV-Peaks [mV*min] Standard-Proben (Mittelwert) *	Wiederfindungs- rate [%] aus 2ml Blut	Wiederfindungs- rate [%] aus 2ml Blut (Mittelwert)
1000 ng	6,4 7,0 7,2 4,5 5,2 6,5	10,3	62 68 70 44 50 63	60
500 ng	3,3 2,6 3,5	5,7	58 46 61	55
250 ng	1,9 1,5 1,6	2,8	68 54 57	60
100 ng	0,4 <0> 0,4	0,8	50 <0> 50	50

Mittelwert der Wiederfindungsraten von KBA : 57%

b)

AKBA	UV-Peaks [mV*min] Etherextraktion aus 2 ml Blut	UV-Peaks [mV*min] Standard-Proben (Mittelwert) *	Wiederfindungs- rate [%] aus 2ml Blut	Wiederfindungs- rate [%] aus 2ml Blut (Mittelwert)
1000 ng	6,4 6,0 7,0 4,7 5,4 7,2	11,2	58 54 63 42 49 65	55
500 ng	2,9 2,3 3,4	5,6	58 46 58	54
250 ng	1,8 1,2 1,3	2,5	72 48 52	57
100 ng	0,3 <0> 0,4	0,6	50 <0> 66	55

Mittelwert der Wiederfindungsraten von AKBA : 56%

* siehe Tab.4

Tab. 4 : Standard-HPLC-Läufe mit definierten Mengen an KBA (a) bzw. AKBA (b) und Berechnung der Flächen (mV*min) ihrer UV-Peaks

a)

KBA UV-Peaks	<i>0,1 µg</i>	<i>0,25 µg</i>	<i>0,5 µg</i>	<i>1 µg</i>
<i>Probe 1 [mV*min]</i>	0,46	2,60	4,84	10,51
<i>Probe 2 [mV*min]</i>	0,99	2,51	6,16	11,11
<i>Probe 3 [mV*min]</i>	1,06	3,24	5,36	10,39
<i>Probe 4 [mV*min]</i>	0,68	2,65	6,11	9,42
<i>Probe 5 [mV*min]</i>				10,24
<i>Probe 6 [mV*min]</i>				10,35
<u><i>Mittelwert [mV*min]</i></u>	0,79	2,75	5,67	10,34
<i>Standard- abweichung</i>	0,24	0,28	0,50	0,49

b)

AKBA UV-Peaks	<i>0,1 µg</i>	<i>0,25 µg</i>	<i>0,5 µg</i>	<i>1 µg</i>
<i>Probe 1 [mV*min]</i>	0,38	2,41	3,77	11,00
<i>Probe 2 [mV*min]</i>	0,62	2,55	4,75	13,90
<i>Probe 3 [mV*min]</i>	0,85	2,60	5,70	10,54
<i>Probe 4 [mV*min]</i>	0,39		6,09	9,17
<i>Probe 5 [mV*min]</i>			7,6	
<i>Probe 6 [mV*min]</i>				
<u><i>Mittelwert [mV*min]</i></u>	0,56	2,52	5,58	11,15
<i>Standard- abweichung</i>	0,19	0,08	1,28	1,72

3.6. Extraktion der Boswelliasäuren aus Hirngewebe

Beide Boswelliasäuren konnten mit den beschriebenen Verfahrensweisen in markiertem Hirngewebe detektiert werden.

Die extrahierten Proben aus Hirngewebe ohne zugesetzte Boswelliasäuren zeigten im UV-Chromatogramm keine Peaks im Bereich der Retentionszeiten von KBA und AKBA (Abb.16). Der abgebildeten Negativkontrolle ist zum Vergleich ein UV-Chromatogramm einer Extraktion aus einem Rattengehirn, das mit 1µg KBA sowie AKBA versetzt wurde, gegenübergestellt (Abb.17).

Bei der Berechnung der Wiederfindungsraten der Boswelliasäuren wurden die Ergebnisse aus dem Probenaufbreitungsverfahren mit Einsatz der Festphasenextraktion getrennt von den Resultaten der Aufbereitung ohne eine solche Probenaufreinigung analysiert.

Bei der Verfahrensweise mit Einsatz der Festphasenextraktion zur Probenaufreinigung ergab sich in der HPLC-Analytik eine Wiederfindungsrate von im Mittel 34% (n = 6, Standardabweichung 0,026). Wurden die Wiederfindungsraten von KBA und AKBA getrennt berechnet, so ergab sich im Falle von KBA ein Wert von 34 % (n= 3), die Ausbeute von AKBA lag mit 33 % (n = 3) knapp darunter (Tab.5).

Die Wiederfindungsrate der Boswelliasäuren lag bei der Probenaufbereitung ohne Festphasenextraktion im Mittel bei 37 % (n = 10, Standardabweichung 0,096). Die getrennte Auswertung der Wiederfindung von KBA und AKBA ergab für KBA eine Rate von 30 % (n = 5) und für AKBA von 44 % (n = 5) (Tab. 6).

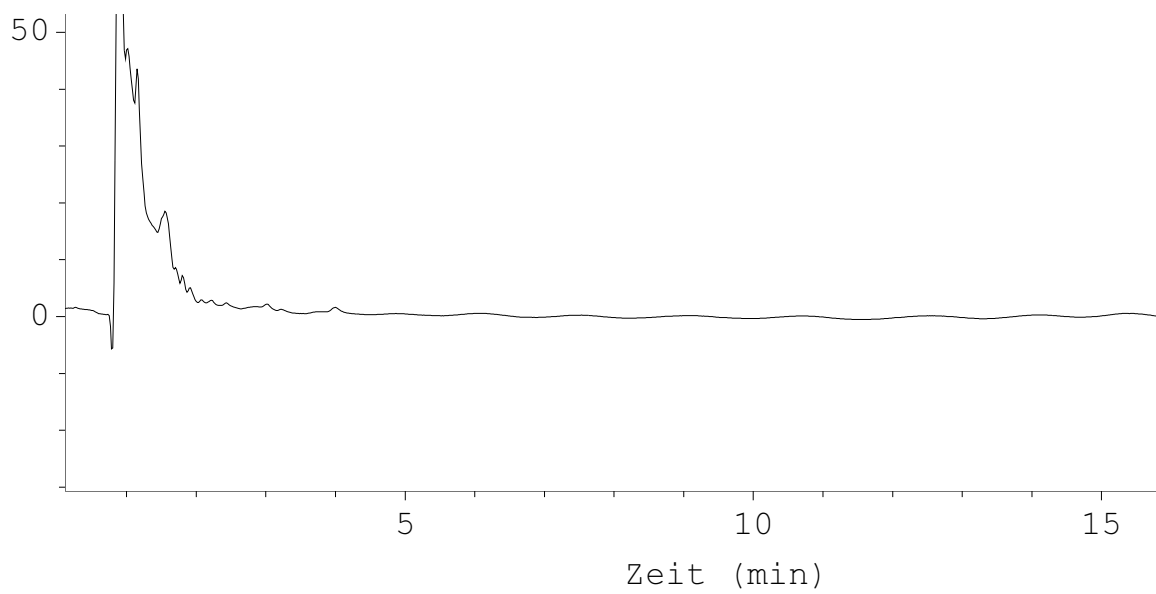


Abb.16: Extraktion aus nicht markiertem Hirngewebe (Negativkontrolle): Keine interferierenden Peaks.

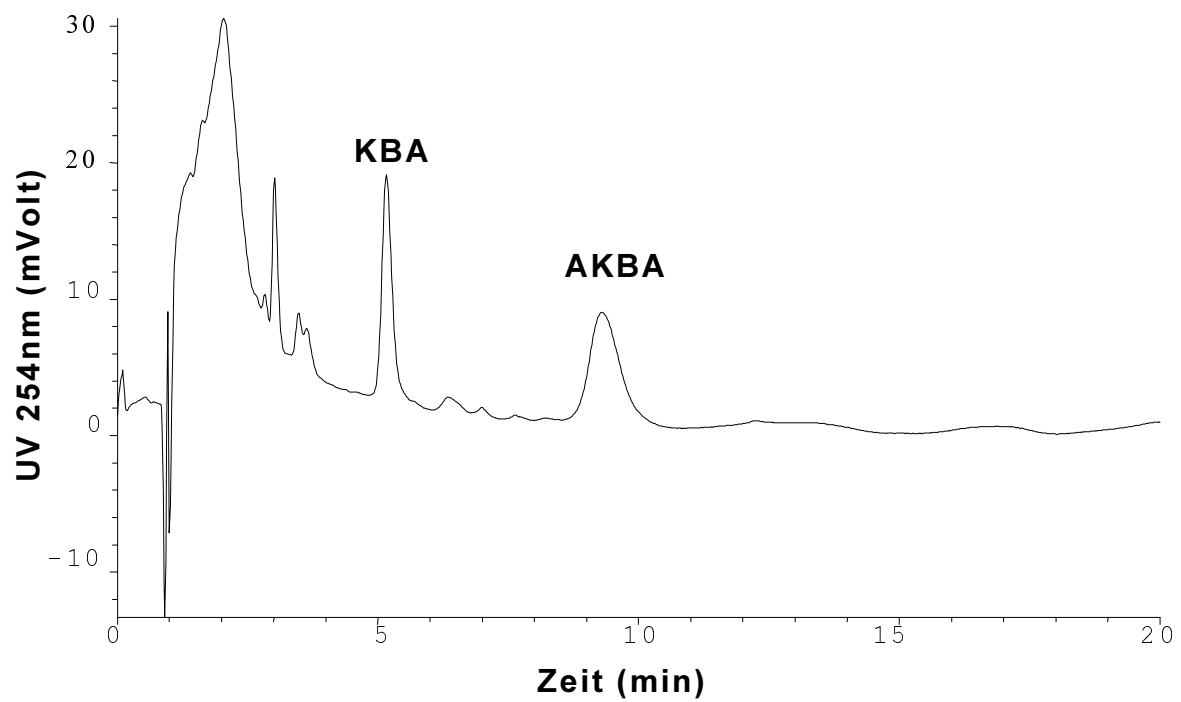


Abb.17: UV-Chromatogramm mit den Peaks von KBA und AKBA nach Extraktion von Hirngewebe, das mit 1 μ g KBA und AKBA markiert wurde.

Tab.5: Flächen der Peaks von KBA und AKBA im UV-Chromatogramm nach Extraktion aus markiertem Hirngewebe (mit Festphasenextraktion) und Berechnung der Wiederfindungsraten

	Hirngewebe Trocken- gewicht [mg]	UV-Peak [mV*min] Hirnextraktion		UV-Peak [mV*min] Standard		Wieder- findungs- rate [%]	
		KBA	AKBA	KBA	AKBA	KBA	AKBA
Zugesetzte Substanzmenge (Spike) 1 µg	515	3,8	3,6	10,0	11,0	38	33
	466	3,5	3,6			35	33
Zugesetzte Substanzmenge (Spike) 2 µg	507	6,0	7,3	20,0	21,0	30	35
Wieder- findungs- Rate, Mittelwert [%]						34	33

Tab.6: Flächen der Peaks von KBA und AKBA im UV-Chromatogramm nach Extraktion aus markiertem Hirngewebe (ohne Festphasenextraktion) und Berechnung der Wiederfindungsraten

	Hirngewebe Trocken- gewicht [mg]	UV-Peak [mV*min] Hirnextraktion		UV-Peak [mV*min] Standard		Wieder- findungs- Rate [%]	
		KBA	AKBA	KBA	AKBA	KBA	AKBA
Zugesetzte Substanzmenge (Spike) 1 µg	555	1,0	1,2			37	48
	445	0,8	1,1	2,7	2,5	30	44
	411	0,8	1,3			30	52
Zugesetzte Substanzmenge (Spike) 2 µg	448	1,8	2,6			32	46
	456	1,3	1,7	5,7	5,6	23	30
Wieder- findungs- Rate, Mittelwert [%]						30	44

3.7. Formulierung für die Boswelliasäuren

In der Lipidemulsion wurde eine rückstandslose Lösung der beiden Boswelliasäuren erreicht. Nach Zentrifugation ließ sich kein Sediment feststellen. Auf dem schwarzen Mikrofilterpapier wurden keine Spuren der Boswelliasäuren in Form eines kristallinen Rückstands nachgewiesen. Aufgrund dieser Befunde wurde die Lipidemulsion (Deltalipid®) als geeignete Formulierung für die Boswelliasäuren angesehen, weshalb sie im Tierversuch eingesetzt wurde.

3.8. Analyse von KBA und AKBA aus H-15-Tabletten

Die Extraktion von 400mg (1Tablette) des Weihrauchextraktes H-15 führte zum Nachweis von KBA und AKBA. Im UV-Chromatogramm (UV 254 nm) zeigten sich zwei deutliche Peaks, welche massenspektrometrisch als KBA und AKBA identifiziert wurden (Abb.18 und Abb.19).

Auf dieser Grundlage erfolgte die Quantifizierung des Gehaltes einer Tablette H15 an KBA bzw. AKBA. Da bei einem Teil der Proben des pulverisierten Tablettenmaterials eine bekannte Menge an Boswelliasäuren zugesetzt war, konnte die Effizienz der durchgeführten Analytik bestimmt werden. Es zeigte sich, dass die zusätzlich zugegebene Menge von 50 µg KBA (bzw. 2,5 µg AKBA) nur zu 10 %, die Menge von 2,5 µg AKBA zu 45 % durch die Analytik nachgewiesen wurde (Tab.7 und Tab.8). Mit Hilfe der errechneten Effizienz des angewandten Extraktionsverfahrens wurde auf den Gehalt an KBA sowie AKBA in einer Tablette H15 rückgeschlossen. Für KBA ergab sich eine Stoffmenge von 3,1 mg, für AKBA wurden 0,5 mg errechnet (Tab.9).

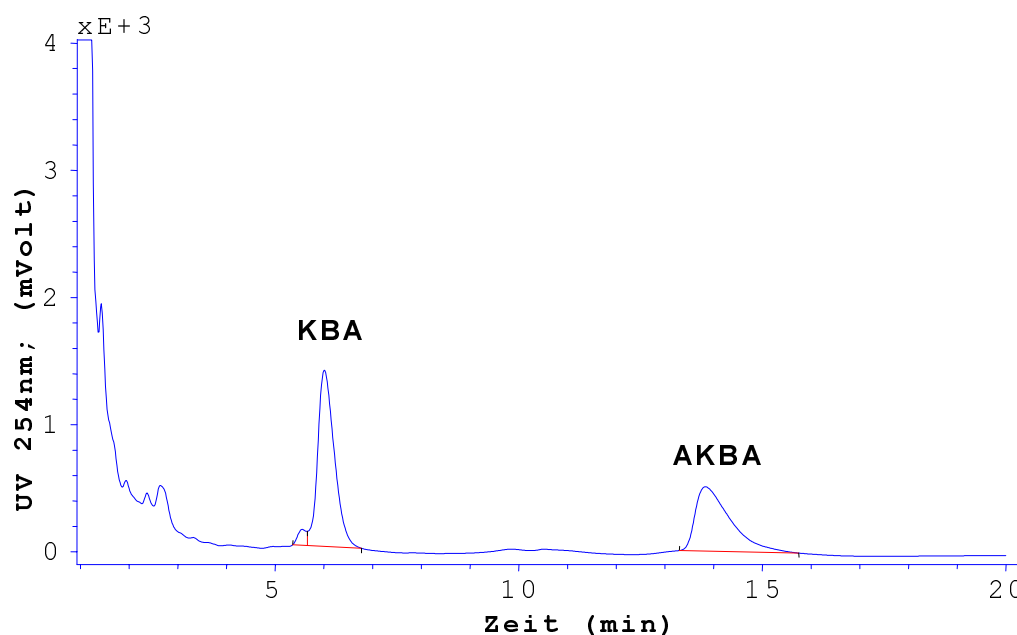


Abb.18: UV-Chromatogramm der Extraktion aus 15mg einer H15-Tablette

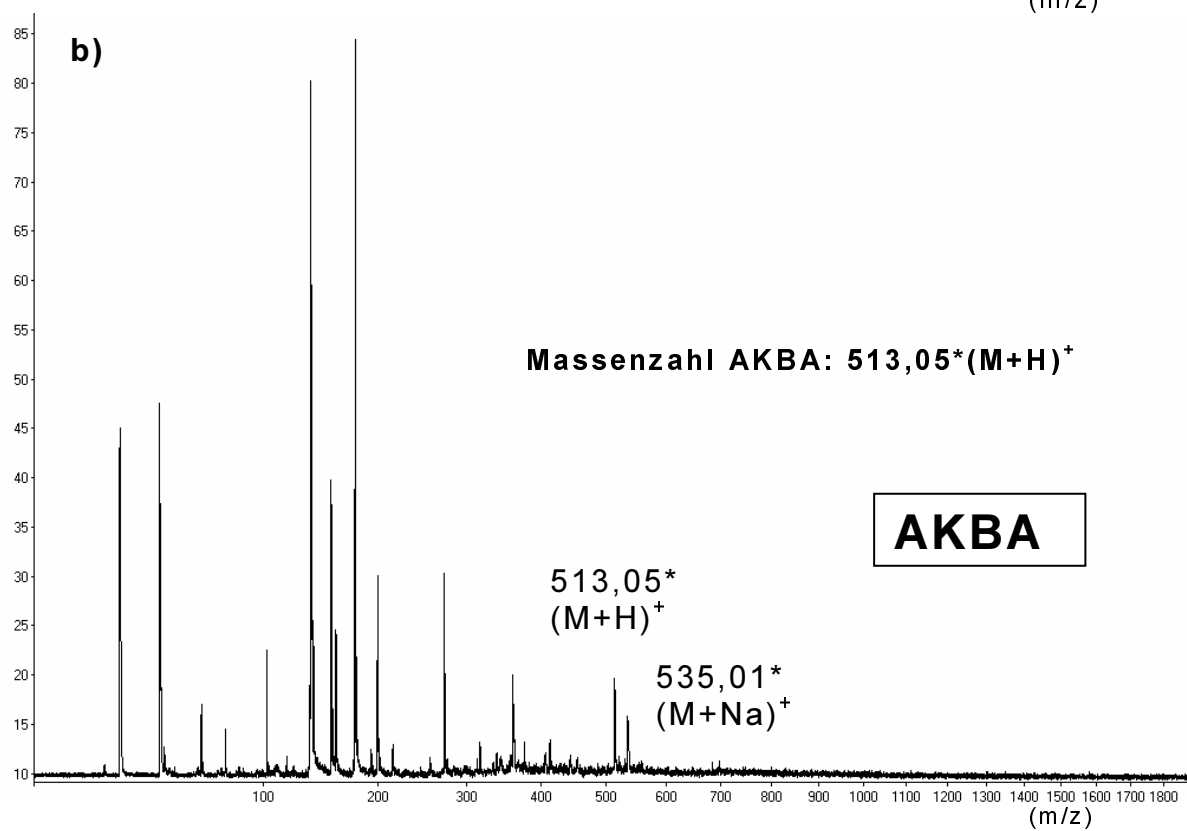
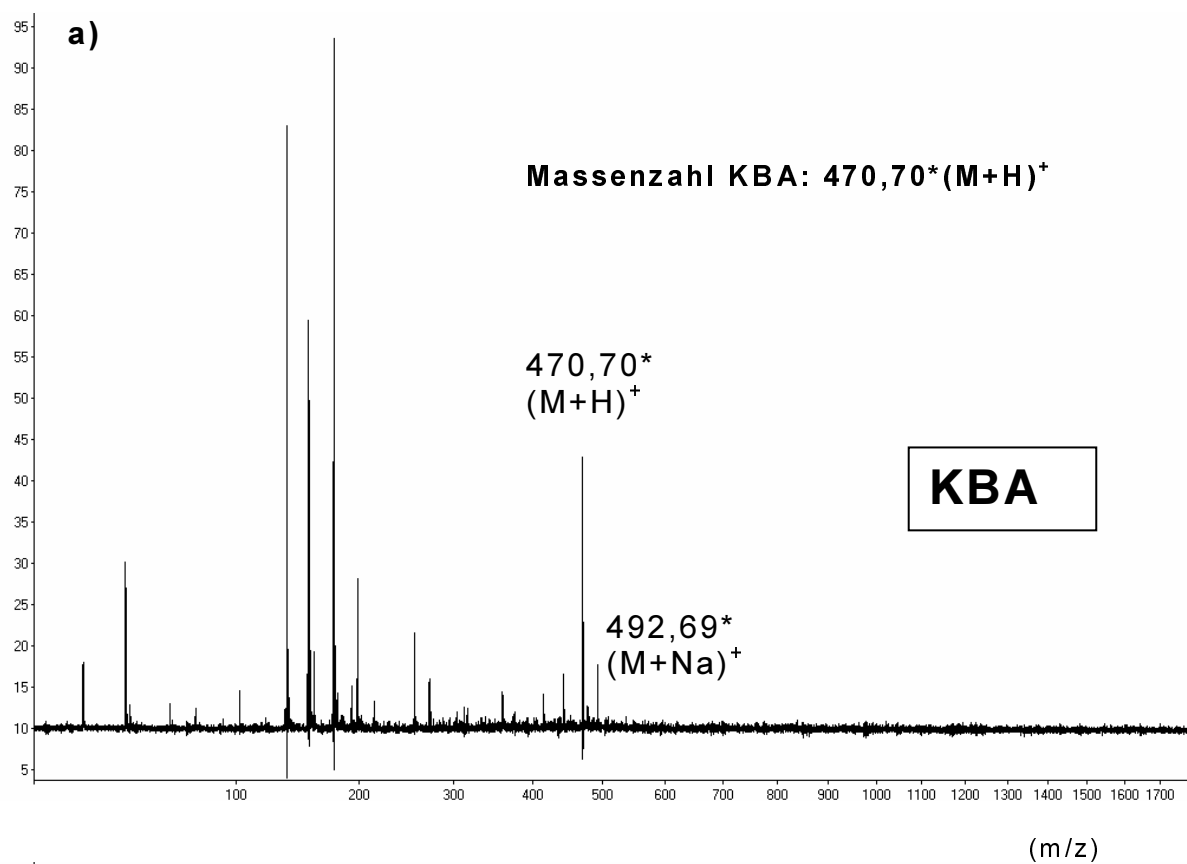


Abb.19: Massenspektrometrische Identifikation von KBA(a) und AKBA (b) aus dem Extrakt von H15

Tab.7: Gemessene Flächen der Peaks von KBA und AKBA im UV-Chromatogramm nach Extraktion von nativen und markierten Proben des Weihrauchpräparates H15 (je 15 mg Tablettenmaterial)

	Fläche UV-Peak (mV*min) KBA	Fläche UV-Peak (mV*min) AKBA	Mittelwert Fläche UV-Peak (mV*min) KBA	Mittelwert Fläche UV-Peak (mV*min) AKBA
15 mg H15 nativ (1)	114,8	82,2	115,8	79,8
(2)	116,9	77,3		
15 mg H15 markiert (1)	163,9	92,3	168,5	92,3
(2)	173,1	92,4		
Standard 5 µg KBA	48,4			
Standard 50 µg KBA	503,0			
Standard 2,5 µg AKBA		25,3		
Standard 5 µg AKBA		48,7		

Tab.8 : Berechnung der Wiederfindungsrate bei der Extraktion aus H15 (H15-Proben markiert mit 50 µg KBA und 2,5 µg AKBA)

	KBA	AKBA
Flächenzuwachs [mV*min] der UV-Peaks in den markierten H15-Proben (Mittelwert)	52,7	12,5
Standard 50 µg KBA / 2,5 µg AKBA [mV*min]	503,0	25,3
Wiederfindungsrate der zugesetzten Substanzmengen	10%	45%

Tab.9 : Berechnung des Gehaltes von KBA bzw. AKBA in einer H15-Tablette (400mg) anhand der Wiederfindungsrate des eingesetzten Extraktionsverfahrens.

	Fläche UV-Peak (mV*min), gemessener Mittelwert	Substanzmenge in HPLC-Analyse (µg) *	Substanzmenge im Tablettenmaterial, berechnet durch Wiederfindungsrate (µg)
<u>KBA</u> in 15mg H15	115,8	11,5	115,0
<u>KBA</u> in 400mg H15			3067,0
<u>AKBA</u> in 15mg H15	79,8	7,9	17,6
<u>AKBA</u> in 400mg H15			469,3

- * Die Berechnung der Substanzmengen von KBA bzw. AKBA erfolgte mittels Dreisatz aus den Werten der Standard-Proben (50µg KBA = 503 mV*min ; 2,5 µg AKBA = 25,3 mV*min).

3.9. Anwendungen der entwickelten Verfahren

3.9.1. Blutuntersuchung bei Probanden nach Einnahme von H15

Bei allen Probanden und Patienten gelang nach oraler Medikation mit einem Weihrauch-Präparat der Nachweis von KBA im Blut. Die Blutspiegel sowie das angewandte Präparat und seine Dosierung sind tabellarisch dargestellt (Tab.10 und Tab.11).

Von einem Probanden sind UV-Chromatogramme der Extraktionen aus Blut vor der Tabletteneinnahme und zwei Stunden nach der Einnahme von 1600mg H15 abgebildet. Die „Leerprobe“ zeigt im Vergleich zum UV-Chromatogramm der Extraktion nach oraler Medikation keinen Peak an der Position von KBA auf (Abb.20).

Die Detektion von AKBA gelang zumeist nur in kleinsten Spuren mit Konzentrationen zwischen 0,1 und 7 ng pro Milliliter Blut. Bei einem Probanden, dessen Blut nach der Einnahme von H15 mehrfach im Verlauf der Zeit untersucht wurde, fand sich ein UV-Peak von AKBA, der einer maximalen Konzentration von 171 ng pro 2 ml Blut entsprach. Dieser UV-Peak nahm im Zeitverlauf der Blutuntersuchungen parallel zu dem UV-Peak von KBA an Größe zu und wieder ab (Abb.21). Die im Blut dieses Probanden gefundenen Substanzmengen sind nachfolgend im Verlauf der Zeit graphisch dargestellt (Abb.22).

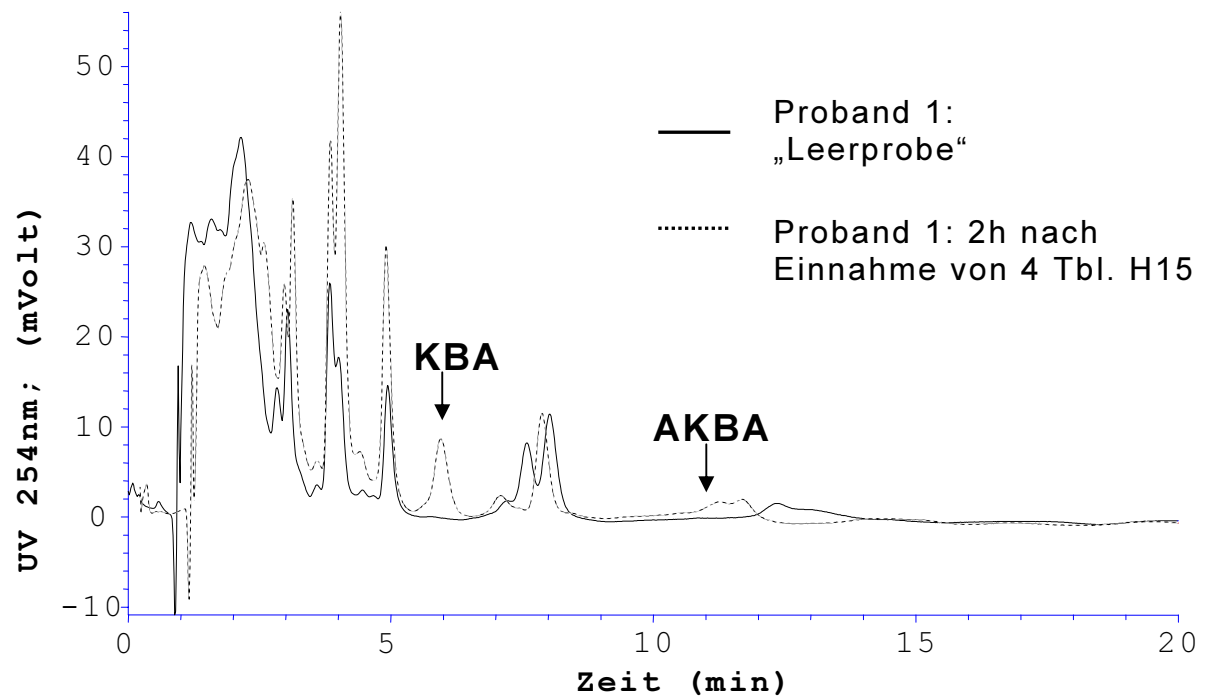


Abb.20: UV-Chromatogramm einer Negativkontrolle (Extraktion aus nicht markiertem Blut) im Vergleich zum UV-Chromatogramm einer Blutprobe des gleichen Probanden 2Std. nach Medikation mit H15

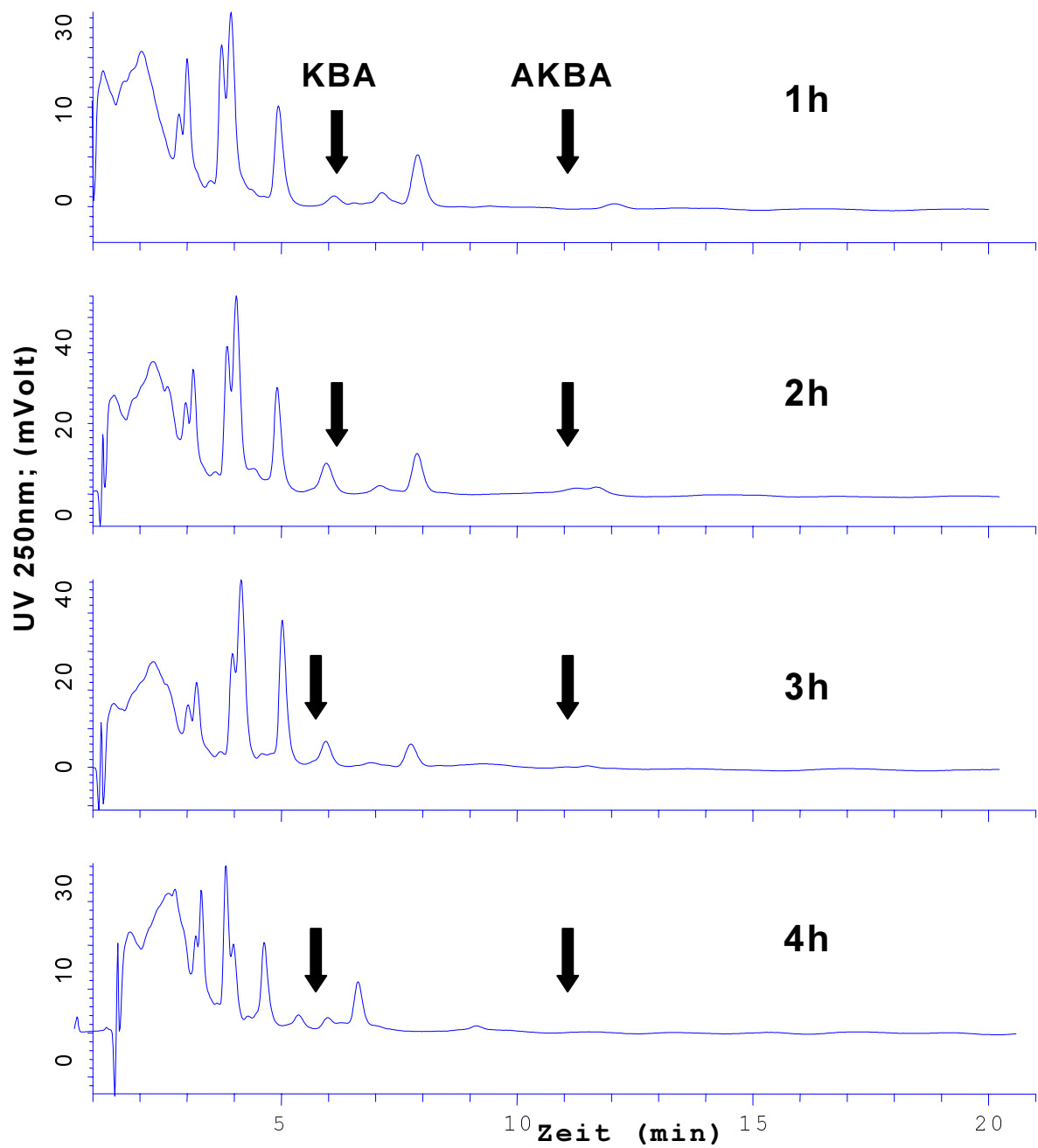


Abb.21: UV-Chromatogramme der Blutspiegel von Proband 1 nach Einnahme von 4 Tabletten H15 im Zeitverlauf

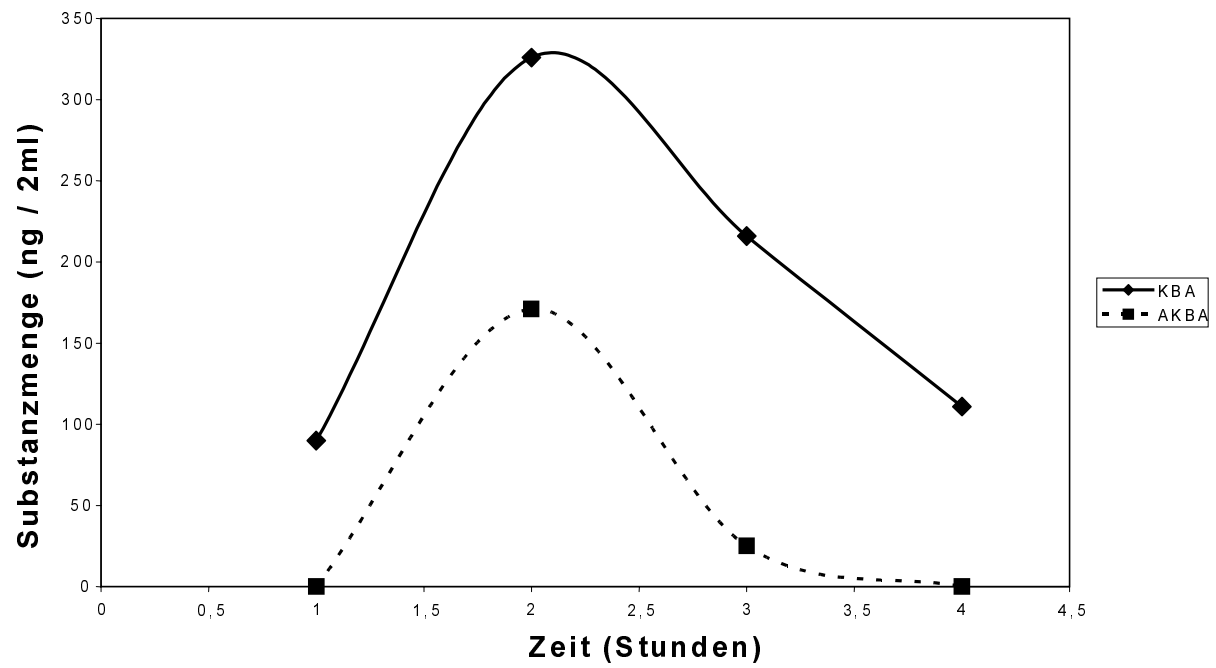


Abb.22: Graphische Darstellung der Blutspiegel von KBA und AKBA im Zeitverlauf bei Proband 1

Tab.10: Blutspiegel an KBA bei Probanden nach oraler
Einnahme von 1600 mg H15 im Zeitverlauf (ng/ml)

Proband	Dosis, Präparat*	Nullwert vor Medikation	1 Stunde KBA [ng/ml]	1,5 Stunden KBA [ng/ml]	2 Stunden KBA [ng/ml]	3 Stunden KBA [ng/ml]	4 Stunden KBA [ng/ml]	5 Stunden KBA [ng/ml]
1	1600mg	0	45	--	163	108	--	60
2	1600mg	0	273	--	35	26	0	--
3	1600mg	0	0	146	1017	0	0	--
4	1600mg	0	125	--	--	--	--	--

*H15, Pharmasan, Freiburg

-- = nicht gemessen

Tab.11: Blutspiegel an KBA bei Patienten nach oraler
Einnahme von 1600 mg H15 im Zeitverlauf (ng/ml)

Patient	Dosis pro Tag, Präparat*	Ausgangswert vor Tages- Medikation	1 Stunde KBA [ng/ml]	2 Stunden KBA [ng/ml]	? Stunden KBA [ng/ml]*
1	4 x 1200mg H15 (Sallaki, Indien)	44	42	87	
2	4 x 1600mg H15 (Gufic, Bombay)	9	13	18	
3	3 x 1600 mg H15 (ZAFES, Saarbrücken)	33,1	--	--	
4	4 x 1600mg H15 (Pharmasan, Freiburg)	0	0	294	
5 (1) (2) (3)	4 x 1600mg H15 (Pharmasan, Freiburg)				112 81 30

*zeitlicher Zusammenhang zur Tabletteneinnahme unbekannt

3.9.2. Detektion der Boswelliasäuren aus Blut und Hirngewebe im Tierversuch

Die Extraktionen aus je 2ml Blut von drei unterschiedlichen Ratten ohne Zugabe von Boswelliasäuren ergaben UV-Chromatogramme ohne störende Peaks im Bereich der Retentionszeiten von KBA und AKBA (Abb.23).

Sowohl nach oraler als auch intravenöser Applikation von 4,7mg KBA und 5,3 mg AKBA konnten bei den Tieren beide Boswelliasäuren im Blut detektiert werden. Bei dem Tier mit oraler Medikation konnten durch Ausbluten 2 ml Blut gewonnen werden, bei dem anderen konnten 5ml Blut asserviert werden. Die gesamte von den Tieren gewonnene Menge an Blut wurde mit Diethylether extrahiert und mittels HPLC-Analytik untersucht. Die UV-Chromatogramme der Extraktionen aus dem Blut beider Tiere sind abgebildet (Abb.24).

Bezogen auf ein Blutvolumen von 5ml ergaben sich zu den gemessenen Zeitpunkten Stoffkonzentrationen von etwa 1µg KBA und 1,4µg AKBA nach i.v.-Applikation sowie 375ng KBA und 425ng AKBA nach oraler Verabreichung.

Geringe Mengen von KBA und auch AKBA konnten durch das eingesetzte Extraktionsverfahren im Hirngewebe der Tiere nachgewiesen werden (Abb.25). Im Vergleich zu Negativkontrollen zeigten die UV-Chromatogramme kleine UV-Peaks im Retentionsbereich von KBA und AKBA (s. Abb.16).

Es errechneten sich bezogen auf 0,5g trockenes Hirngewebe Konzentrationen von 198ng KBA und 515ng AKBA nach i.v.-Gabe sowie 161ng KBA und 379ng AKBA nach oraler Darreichung.

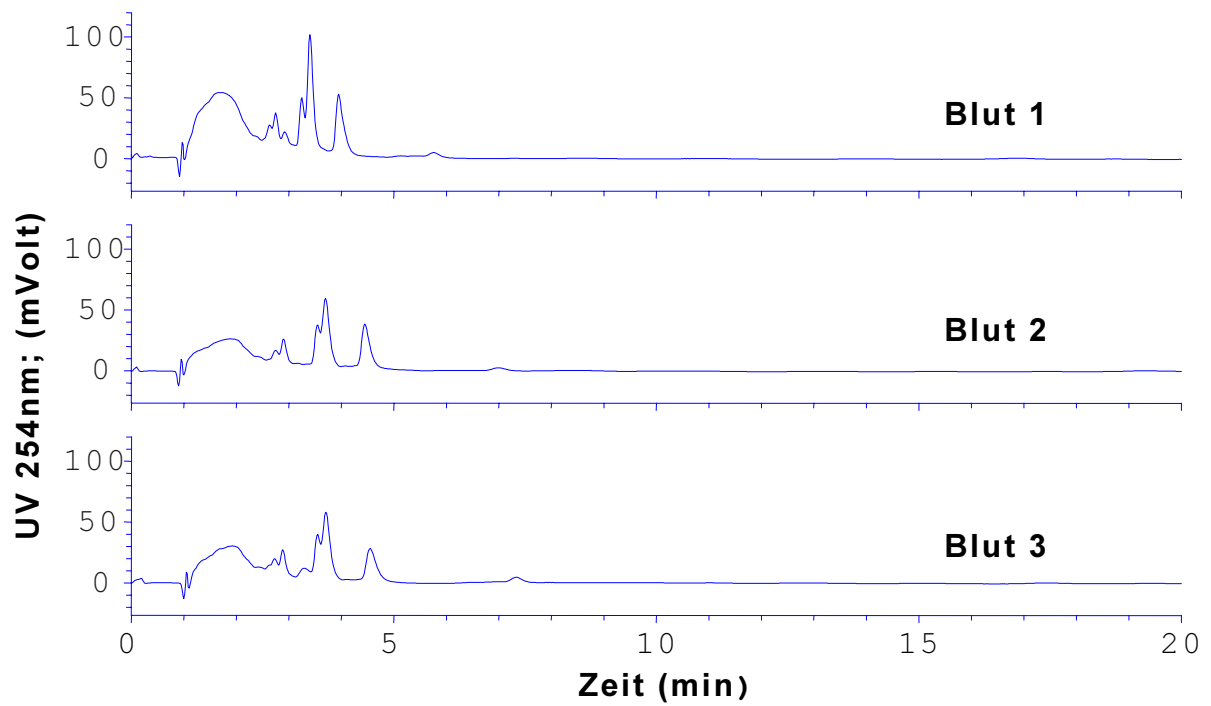


Abb.23: Negativkontrollen: UV-Chromatogramme nach Ether-Extraktion aus nicht markiertem Blut von drei Ratten: Keine interferierenden Peaks.

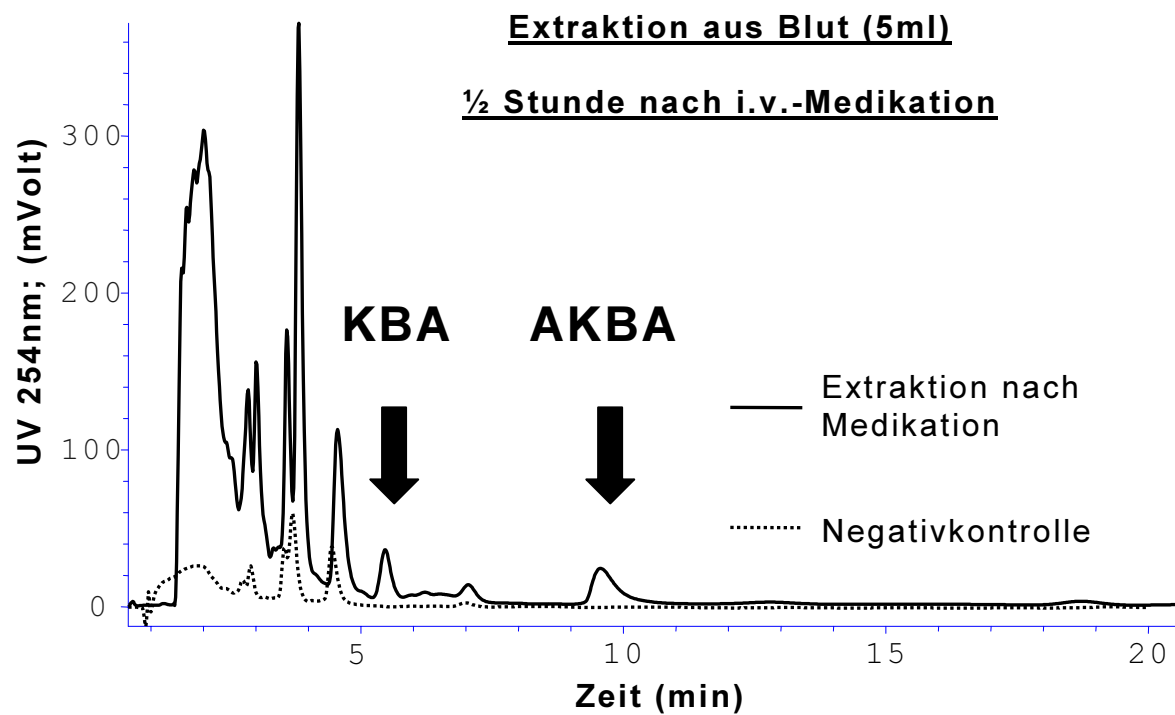
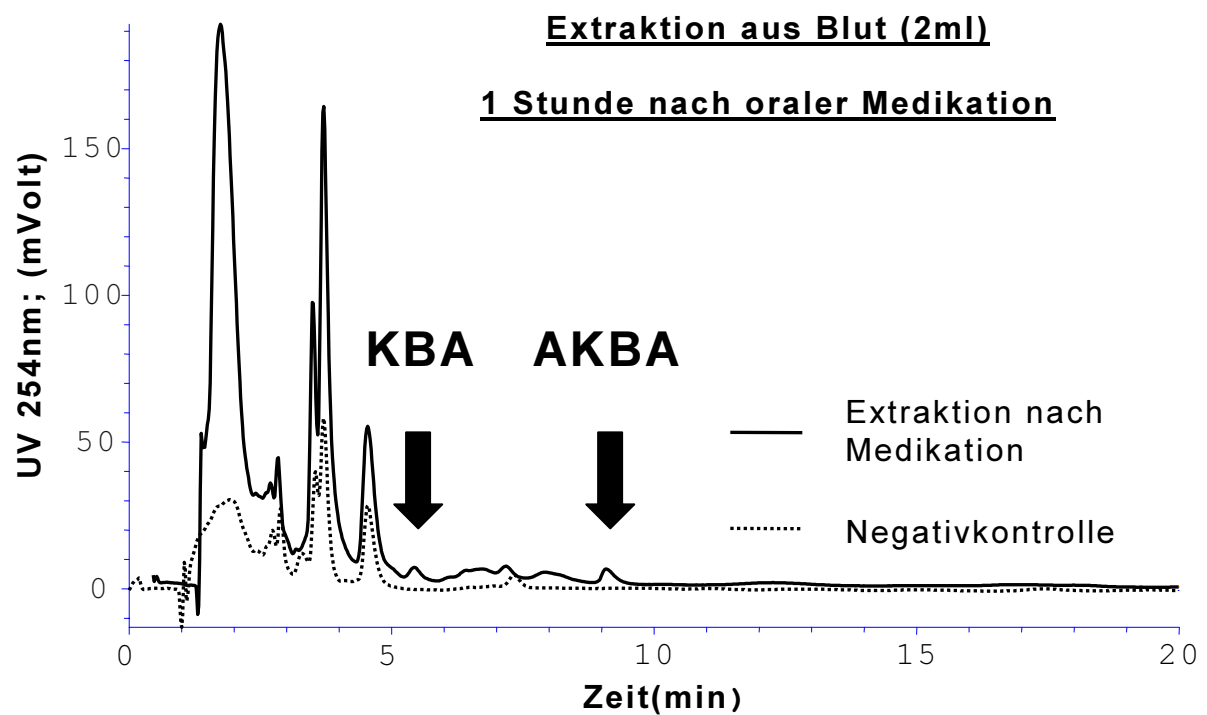


Abb.24: UV-Chromatogramme der Ether-Extraktion von Rattenblut nach oraler bzw. iv-Medikation der Tiere, unterlegt Chromatogramm einer Negativkontrolle

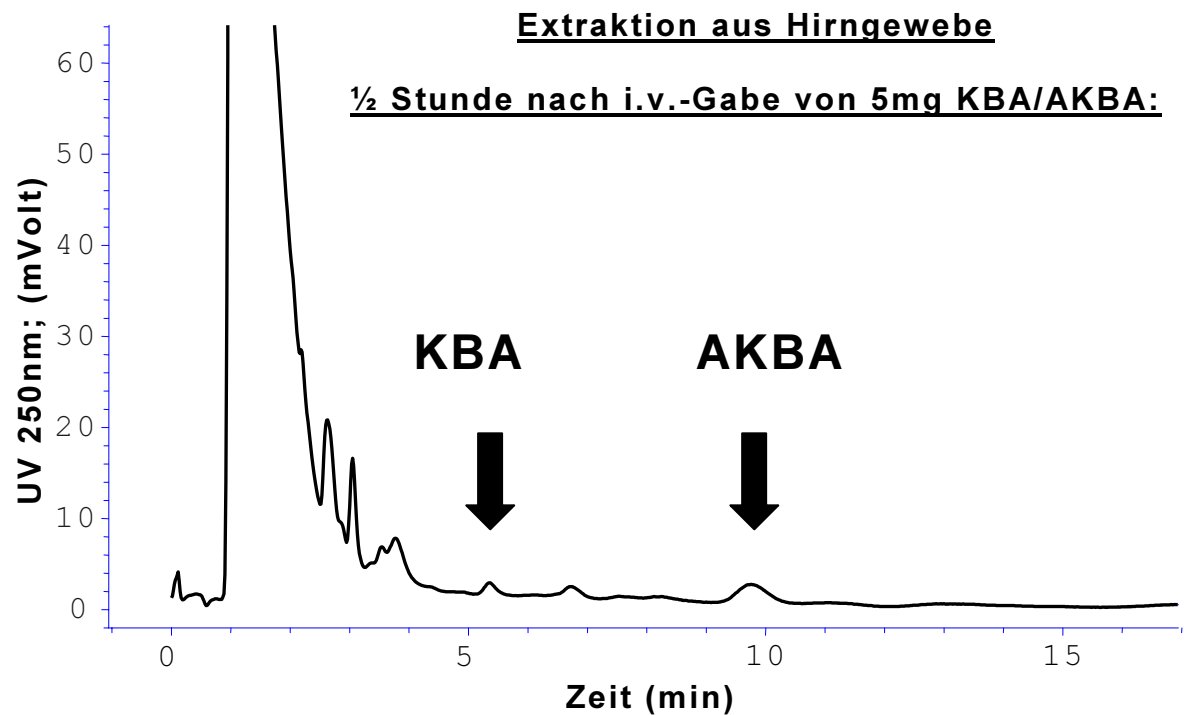
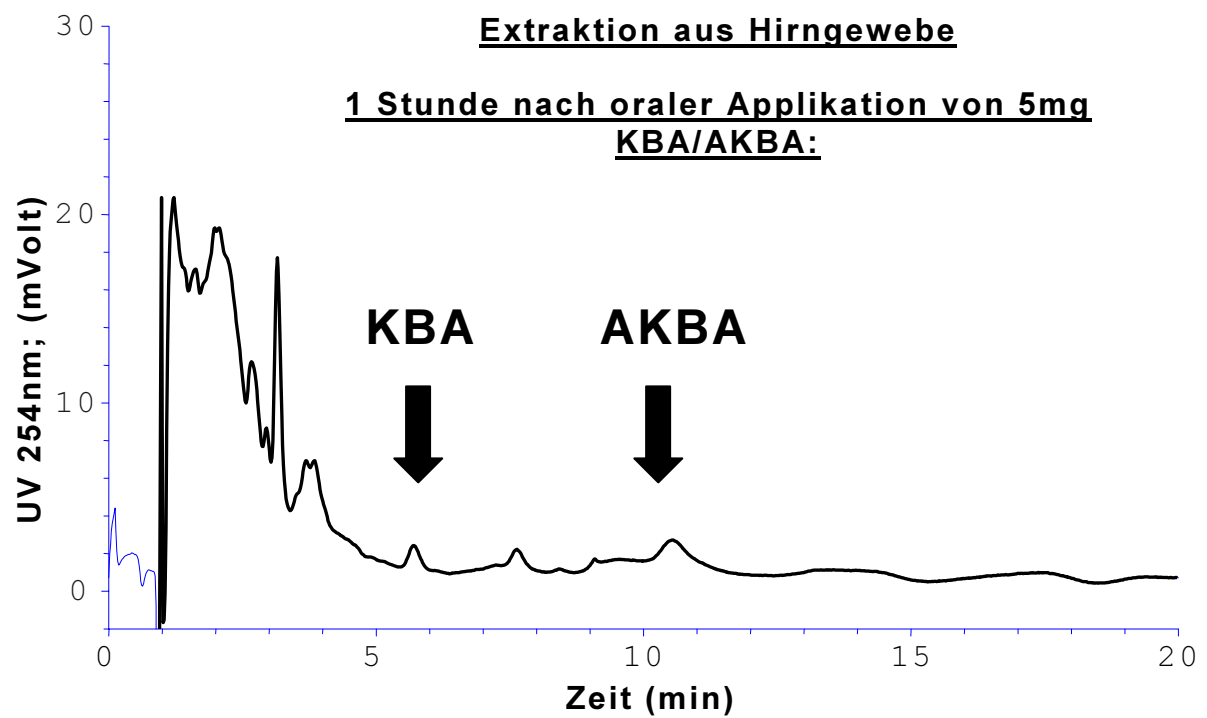


Abb.25: UV-Chromatogramme der Extraktion des Hirngewebes nach oraler bzw. iv-Medikation der Tiere

4. Diskussion

4.1. Weihrauch-Extrakt in der klinischen Anwendung

4.1.1. H15 in der Therapie von malignen Gliomen

Bei Patienten mit malignen Gliomen wurde das Phytotherapeutikum „Weihrauch“ in klinischen Studien bzw. Therapieversuchen verschiedentlich eingesetzt.

Eine klinische Studie, bei der unter der Medikation mit dem Weihrauch-Extrakt H15 eine dosisabhängige Reduktion des peritumoralen Hirnödems dokumentiert werden konnte, wurde bereits in der Einleitung erwähnt. Bei dieser Studie wurden 29 Patienten mit Glioblastomen eingeschlossen und drei Gruppen mit unterschiedlicher Dosierung des Weihrauch-Extraktes untersucht. Die Prüfgruppe mit der höchsten Dosierung zeigte eine signifikante Reduktion des Quotienten aus Ödem- und Tumolvolumen im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen (Böker und Winking, 1997).

In Form des Präparates H15-Ayurmedica wurde Weihrauch-Extrakt als zusätzlicher Therapieversuch in die Behandlung von Kindern und jungen Erwachsenen mit malignen Gliomen aufgenommen. In einem Einzelfall konnte hierbei durch die Gabe von H15 (maximale Dosis: 126 mg / kgKG / die) die Therapie mit Glukokortikosteroiden eingespart werden, wobei der Rückgang des peritumoralen Ödems kernspintomographisch dokumentiert wurde. In einigen Fällen wurde eine vorübergehende Besserung von neurologischen

Herdsymptomen festgestellt und bei mehreren Patienten konnten Verbesserungen des körperlichen Allgemeinzustandes beobachtet werden. Bei diesen positiven Therapieergebnissen konnten teilweise überlappende Effekte von Radiotherapie und Chemotherapie nicht ganz ausgeschlossen werden. Zusätzlich floss ein potentieller Placeboeffekt in diese Ergebnisse mit ein (Janssen et al., 2000).

4.1.2. Vor- und Nachteile des Phytotherapeutikums Weihrauch

Das pflanzliche Weihrauch-Extrakt beinhaltet ein Gemisch aus vielen unterschiedlichen Substanzen, wobei auch die Boswelliasäuren in Form von mehreren verschiedenen Derivaten vorliegen. Nach einem Leitsatz der Phytotherapie ist es gerade das Zusammenspiel der unterschiedlichen Inhaltsstoffe, das zum einen die arzneiliche Wirkung und zum anderen die Verträglichkeit des pflanzlichen Pharmakons bestimmt (Teuscher, 1997).

Das Zusammenspiel von verschiedenen Derivaten der Boswelliasäuren bei der pharmakologischen Gesamtwirkung birgt andererseits möglicherweise eine bedeutsame Schwäche des Weihrauch-Therapeutikums in sich. Boswelliasäuren zeigen die Besonderheit, als allosterische Regulatoren direkt die Aktivität des Enzyms 5-Lipoxygenase zu beeinflussen. Hierdurch unterscheiden sie sich übrigens von anderen bekannten Leukotriensynthese-Inhibitoren, deren Wirkung auf einem Redox-Mechanismus oder auf einer kompetitiven Blockierung der Umsetzung des Substrates Arachidonsäure beruht (Sailer et al., 1998). Strukturvoraussetzung für die Bindung an die 5-Lipoxygenase scheint das 5-Ring-Grundgerüst der Triterpene zu sein. Zur kompletten intrinsischen Hemmung des Enzyms ist die 11-keto-Funktion sowie eine

hydrophile Gruppe am C4-Atom erforderlich (Sailer et al., 1996). Dies erklärt Unterschiede in der Wirksamkeit der Boswelliasäuren, wobei Acetyl-11-keto- β -Boswelliasäure der potenteste Inhibitor des Enzyms ist (Safayhi et al., 1992). Pentazyklische Triterpenverbindungen ohne 11-keto-Funktion, z.B. Acetyl- β -Boswelliasäure und β -Boswelliasäure, agieren als partielle Inhibitoren (Sailer et al., 1996). Diese Verbindungen üben eine deutlich schwächere Hemmwirkung auf die 5-Lipoxygenase aus. Treten sie in Konkurrenz zu den Enzyminhibitoren mit kompletter intrinsischer Aktivität, können sie den Wirkeffekt antagonisieren. So konnte gezeigt werden, dass β -Boswelliasäure die Wirkung von Acetyl-11-keto- β -Boswelliasäure teilweise aufhebt (Sailer et al., 1996). Es wurde demonstriert, dass bei der Aufarbeitung von Weihrauchextrakten in methanolischen Lösungsmitteln zusätzlich Analoga der Boswelliasäuren entstehen können, die als inkomplette Inhibitoren der 5-Lipoxygenase die Potenz der Leukotriensynthese-Blockade durch Weihrauchextrakt herabsetzen (Schweizer et al., 2000). Tatsächlich wurden bei Untersuchungen von handelsüblichen Extrakten aus dem Harz von *Boswellia serrata* konzentrationsabhängig hemmende sowie stimulierende Effekte auf die 5-Lipoxygenase nachgewiesen (Safayhi et al., 2000; Boden et al., 2001). Als Leukotriensyntheseagonist im Weihrauchextrakt wurde das tetracyklische Triterpen 3-oxo-Tirucallsäure identifiziert. Dieses kann konzentrationsabhängig die Leukotriensynthese steigern (Boden et al., 2001).

Aus den Analysen von Weihrauchextrakten wird deutlich, dass eine Standardisierung von phytopharmakologisch eingesetzten Extrakten wegen der Schwankungen ihrer Inhaltsstoffe wichtig ist.

4.2. Methoden und Ergebnisse der experimentellen Arbeit

4.2.1. Verfahrenstechniken zur HPLC-Analytik

1978 trennten Pardhy und Bhattacharyya aus Salai Guggal isolierte Boswelliasäuren säulenchromatographisch auf, um mit Verfahrensweisen wie der Massenspektrometrie und der NMR-Spektrometrie die molekulare Struktur von mehreren Boswelliasäuren aufzuschlüsseln (Pardhy et al., 1978). Unter verschiedenen Zielsetzungen wurden seither HPLC-Verfahrenstechniken zur Auftrennung von Vertretern der Boswelliasäuren in der Literatur beschrieben (Schweitzer et al., 2000; Tawab et al., 2001; Simmet et al., 2004). Die in der eigenen Arbeit vorgestellte isokratische HPLC-Methodik zur Detektion von KBA und AKBA wurde unabhängig von bereits veröffentlichten Verfahrenstechniken etabliert.

Es wurden zur chromatographischen Analyse von KBA und AKBA HPLC-Methoden für ein konventionelles HPLC-System sowie für ein hoch empfindliches Nano-HPLC-System entwickelt. Die angewandten isokratischen Trennverfahren bieten den Vorzug, dass viele Probenläufe rasch hintereinander ausgeführt werden können, da keine Äquilibration der HPLC-Säule zwischen den einzelnen Probenläufen durchgeführt werden muß. Das konventionelle HPLC-System erwies sich als ausreichend sensibel, um kleine Mengen an KBA in Vollblutproben zu detektieren.

Das Nano-HPLC-System erlaubte eine Detektion der Boswelliasäuren bis in einen Konzentrationsbereich von etwa 0,5 ng/µl. Vorteilhaft war zugleich die Online-Koppelung des Nano-HPLC-Systems an eine ESI-MS-Anlage, welche eine unmittelbare massenspektrometrische Identifikation der detektierten Substanzen erlaubte.

Jedoch stellten sich bei der Anwendung dieses Systems im Vergleich zu einer konventionellen HPLC-Anlage auch Nachteile heraus. Die hohe Sensitivität des Nano-HPLC-Systems war unter den technisch vorgegebenen Bedingungen limitiert durch das maximale Injektionsvolumen von 1 μl . Geht man von einem Mindestvolumen von 25 μl zum Lösen einer organischen Probe aus, so konnte lediglich 4% einer Probe zur Analytik in das HPLC-System injiziert werden. Bei der Analytik von organischen Proben forderte das System sehr hohe Ansprüche an die Reinheit der analysierten Proben. Gerade die Aufarbeitung von Blut- oder Gewebeproben brachte eine hohe Belastung an organischen Verbindungen mit sich. Aus technischen Gründen stehen für ein Nano-HPLC-System keine Vorsäulen zur Verfügung, welche die HPLC-Säule vor Verunreinigungen schützen könnten. Die Nano-HPLC-Säule erwies sich dementsprechend als störanfällig und verlor unter Umständen relativ rasch ihre Trennleistung. Nachteilig waren auch die hohen Kosten einer Nano-HPLC-Säule im Vergleich zu konventionellem HPLC-Equipement.

Aus diesem Grund wurde schließlich zur Verfahrensentwicklung der Detektion von Boswelliasäuren aus Blut bzw. Hirngewebe auf die konventionelle HPLC-Analytik zurückgegriffen. Hierbei wurde zusätzlich das mögliche Injektionsvolumen bis auf 1000 μl angehoben, so dass problemlos das komplette Extrakt aus einer Blut- bzw. Gewebeprobe zur Analytik auf die HPLC-Säule aufgegeben werden konnte. Auf diese Weise wurde die Effektivität und somit auch die Sensitivität des konventionellen HPLC-Systems zur Detektion von KBA bzw. AKBA aus organischen Proben maximiert.

4.2.2. Stabilität der Boswelliasäuren in Lösungen

Als Besonderheit beim Umgang mit kleinen Konzentrationen von Boswelliasäuren erwies sich die Neigung der lipophilen Substanzen, an Oberflächen zu adsorbieren. Aufgefallen war dies aufgrund von Substanzverschleppungen bei der Nano-HPLC-Analytik. Spuren der Boswelliasäuren waren als UV-Peaks im Chromatogramm von HPLC-Läufen mit reinem Laufmittel sichtbar geworden. Offensichtlich waren geringe Mengen an KBA bzw. AKBA im Probeninjektionssystem adsorbiert worden, denn das Problem ließ sich durch Spülen des Injektionssystems nach jedem HPLC-Lauf eliminieren. In der Literatur finden sich Beispiele für Probenverschleppungen, die aufgrund von Substanzresten im Injektionssystem des HPLC-Systems resultieren. Das Problem wurde ebenfalls durch Spülen zwischen HPLC-Läufen gelöst (Woo et al., 2001).

Auch bei der Aufbereitung von Proben zur HPLC-Analytik zeigte sich, dass bei kleinen Mengen an Boswelliasäuren mit relevanten Substanzverlusten aufgrund von Adsorption an Oberflächen zu rechnen war. Hieraus wurde gefolgert, dass alle Proben zur Detektion von Boswelliasäuren unmittelbar aufgearbeitet und nicht gelagert werden sollten. Für wesentlich größere Substanzmengen an KBA in Lösung wurde in der Literatur keine Instabilität gefunden (Tawab et al., 2001). Die eingesetzte Substanzkonzentration lag jedoch um das zehnfache bis hundertfache über der eigenen Testkonzentration.

4.2.3. Analyse aus Tablettenmaterial von H15

Explorativ wurde Tablettenmaterial des Weihrauchextraktes H15 extrahiert, um die Größenordnung der enthaltenen Mengen an

KBA und AKBA einzuschätzen. Die Extraktion erfolgte über 15 Minuten.

In Untersuchungen von Simmet et al. wurden unterschiedliche handelsübliche pflanzliche Weihrauchpräparate auf den Gehalt an verschiedenen pentacyklischen Triterpensäuren, darunter KBA und AKBA untersucht (Simmet et al., 2004). Zur Extraktion der Präparate wurden optimierte Verfahrensweisen etabliert, der Prozess des Extrahierens wurde dabei über einen Zeitraum von 40 min ausgeführt. Für H15 Tabletten (Ayurmedica, Pöcking) wurde ein Gehalt an KBA zwischen 9,6 mg und 15,6 mg in 4 Tabletten ermittelt, der Gehalt an AKBA war mit Werten zwischen 8,2 mg und 9,5 mg etwas geringer.

Im Vergleich zu dieser Untersuchung erbrachte die eigene Gehaltsanalyse von KBA im Tablettenmaterial von H15 (Pharmasan, Freiburg) übereinstimmende Werte. Da in einer Tablette H15 eine Menge an KBA von 3,1 mg ermittelt wurde, ergibt der Vergleichswert zur oben genannten Analyse einen Gehalt von 12,4 mg in vier Tabletten. Die Bestimmung des Gehaltes an AKBA in der eigenen Analyse ergab einen deutlich kleineren Wert im Vergleich zur oben genannten Untersuchung (2 mg).

4.2.4. Extraktionsverfahren von KBA und AKBA aus Serum

Bei der Entwicklung einer Methodik zum Nachweis der Boswelliasäuren KBA bzw. AKBA aus Blutproben wurde zunächst ein Verfahren getestet, welches in einem ersten Aufarbeitungsschritt die Gewinnung von Serum vorsah. In einem Vorversuch war Humanserum mit den beiden Boswelliasäuren versetzt worden, um daraus die Extraktion mit Hilfe von Acetonitril zu testen. Hierbei

hatte sich eine Ausbeute von 85 % an KBA bzw. AKBA gefunden. Zur Detektion der Boswelliasäuren aus Vollblut wurden zunächst die zellulären Bestandteile mittels Zentrifugieren abgetrennt. Hierbei war zu erwarten, dass in dem abgetrennten Zellmaterial ein gewisser Anteil der Boswelliasäuren gebunden war und mit diesem verloren ging. Es wurde eine maximale Ausbeute von 68 % an KBA bzw. AKBA erzielt. Für die Tatsache, dass sich in den Versuchsreihen eine Schwankungsbreite der Wiederfindungsrate von 14 – 68 % ergab, fand sich keine systematische Erklärung. Die Verfahrenstechnik wurde letztlich aufgegeben, da mit der Methodik der Etherextraktion ein Aufarbeitungsverfahren zur Verfügung stand, welches die Zahl der Aufarbeitungsschritte einer Probe auf ein Minimum reduzierte und somit auch zufällige Fehlerquellen verminderte.

Ein Verfahren zur Extraktion von KBA aus humanem Plasma wurde publiziert (Tawab et al, 2001). Die Wiederfindungsrate aus markiertem Plasma durch die eingesetzte Analytik wurde zu 85,7% bestimmt.

4.2.5. Extraktion von KBA und AKBA aus Vollblut

Als erfolgreiches Extraktionsverfahren zum Nachweis von KBA bzw. AKBA erwies sich der Einsatz von Diethylether. Der Einsatz von Diethylether zur Flüssig-Flüssig-Extraktion von lipophilen Substanzen aus Vollblutproben ist ein in der Literatur mehrfach beschriebenes Verfahren (Wolfram, 1980; McIntyre, 1993; Miller, 1993; Chen, 2001). Das Lösungsmittel kann Vollblut unmittelbar zugesetzt werden ohne dass es zum Einsetzen einer Zytolyse kommt. Nach dem Extraktionsvorgang kann durch Zentrifugieren ein relativ reiner Überstand des Diethylethers gewonnen werden, so dass vor der HPLC-Analytik eine weitere Probenaufreinigung nicht

erforderlich ist. Durch Verdampfen des Diethylethers und Aufnehmen des Extraktes im HPLC-Lösungsmittel lässt sich das Volumen einer Probe einengen. Die geringe Anzahl an Aufarbeitungsschritten des Extraktionsverfahrens konnte als Vorteil der beschriebenen Methodik gelten, da mögliche Substanzverluste beispielsweise aufgrund von Adsorption der Boswelliasäuren an Materialoberflächen durch die geringe Zahl an Arbeitsschritten minimiert wurden. Die Ausbeute des Extraktionsverfahrens aus Blutproben lag im Mittel bei 57% (Standardabweichung 0,084, Varianz 0,007).

4.2.6. Extraktion von KBA und AKBA aus Hirngewebe

Die Aufarbeitung von Hirngewebe zur Analytik von Boswelliasäuren erforderte gegenüber den Blutproben mehr Aufwand bei der Probenaufreinigung. Die Extraktion des lyophilisierten, pulverisierten Gewebes wurde ebenfalls durch kräftiges Durchmischen im Probenrüttler mit Lösungsmitteln durchgeführt. Als geeignetes Lösungsmittel wurde wässriges Acetonitril bestimmt. Nach dem Zentrifugieren entstanden makroskopisch sichtbar trübe Lösungen, so dass das beschriebene Verfahren zur Festphasenextraktion zur weiteren Aufreinigung der Proben angeschlossen wurde. Der Einsatz von C-18-Säulen zur Festphasenextraktion von KBA und AKBA ist in der Literatur beschrieben (Tawab et al., 2001).

Die erzielte Wiederfindungsrate an KBA bzw. AKBA aus markierten Gewebeproben betrug im Mittel 34%.

4.2.7. Pharmakokinetik von KBA

Im Organismus zeigen die meisten Pharmaka in variablem Ausmaß eine reversible Bindung an Plasmaproteine. Im Blut stellt sich abhängig von den Eigenschaften des Pharmakons ein Gleichgewicht zwischen freiem und gebundenem Anteil der Substanz ein. Darüber hinaus werden Pharmaka an eine Vielzahl von Gewbeproteinen und an Membranphospholipiden (Zellmembranen, endoplasmatisches Retikulum) gebunden (Forth et al., 1996). Insbesondere lipophile Arzneistoffe zeigen eine hohe Gewebefixierung und besitzen somit ein großes Verteilungsvolumen. Dies bedeutet, dass der intravasale Anteil der Substanzen sehr klein ausfallen kann (Forth et al., 1996). Aufgrund der lipophilen Eigenschaften der Boswelliasäuren ist für KBA wie auch für AKBA ein großes Verteilungsvolumen anzunehmen.

Die bei Patienten und Probanden intravasal nachweisbare Substanzmenge von KBA stellte somit einen Bruchteil der resorbierten und im Organismus verteilten Stoffmenge dar. Von KBA wurden maximale Konzentrationen im Blut bis etwa 1,0 µg / ml detektiert. Bei den Probanden fanden sich maximale Blutspiegel ein bis zwei Stunden nach der Tabletteneinnahme. Vier Stunden nach der oralen Medikation zeigte sich ein deutlicher Abfall der Substanzkonzentration im Blut.

In der Literatur wurde die Messung des Plasmaspiegels von KBA bei einem Probanden nach oraler Medikation mit Weihrauch-Extrakt publiziert (Tawab et al., 2001). Hierbei wurde eine laboreigene Formulierung für ein handelsübliches Weihrauchpräparat (1600mg) eingesetzt und der Plasmaspiegel im Zeitverlauf ermittelt. Bei dem Probanden konnte eine Plasmakonzentration von KBA über einen Untersuchungszeitraum von acht Stunden nachgewiesen werden. Der maximale Plasmaspiegel (800ng) wurde 1 Stunde nach oraler Medikation detektiert. Da

Plasmaspiegel und Blutspiegel differente Werte darstellen und zudem die Dosierung sowie die Resorptionseigenschaften des eingesetzten Weihrauchextraktes in der genannten Untersuchung nicht bekannt sind, lassen sich diese Ergebnisse nicht unmittelbar mit den eigenen Blutspiegelmessungen vergleichen.

Generell besitzen pharmakokinetische Parameter wie Resorption, Verteilungsvolumen und Metabolismus eine zum Teil erhebliche interindividuelle Schwankungsbreite (Forth et al., 1996), so dass die quantitativen Ergebnisse bei Probanden in Anbetracht der kleinen vorliegenden Probandenzahl zunächst am ehesten explorative Daten repräsentieren.

Bei den untersuchten Patienten wirkt sich auf die Resultate der Blutspiegelbestimmungen zudem einschränkend aus, dass sie Präparate verschiedener Hersteller in teils unterschiedlicher Dosierung einnahmen. Bei den phytopharmakologischen Präparaten können ausserdem zwischen verschiedenen Chargen Unterschiede bzgl. des Gehaltes an den Wirksubstanzen KBA und AKBA auftreten.

4.2.8. Pharmakokinetik von AKBA

Bei Patienten und Probanden blieb der Nachweis von AKBA im Blut bei sehr geringer Substanzmenge unsicher.

Bei der Substanz AKBA ist davon auszugehen, dass die Dosis im handelsüblichen Weihrauch-Extrakt unter der von KBA liegt und somit niedrigere Konzentrationen im Blut zu erwarten sind (Simmet et al., 2004). Zum anderen wurde postuliert, dass AKBA im Organismus möglicherweise rasch deacetyliert wird und somit nicht erfolgreich im Blut detektiert werden kann (Tawab et al., 2001).

Die metabolische Effektivität von Leber, Darm, Plasma oder Nieren bei der Deacetylierung von AKBA im menschlichen Organismus ist nicht spezifisch für diesen Arzneistoff bekannt. Allgemein sind eine Reihe von deacetylierenden hepatischen und extrahepatischen Enzymaktivitäten in der Literatur beschrieben (Kudo, 2000; Arai et al., 2002; Arai, 2002; Pushkin et al., 2004).

Unter Laborbedingungen fand sich zumindest im menschlichen Blut kein Hinweis auf eine enzymatische Aktivität zur raschen Deacetylierung von AKBA. Bei der Verfahrensentwicklung zur Detektion der Boswelliasäuren aus Vollblut wurde EDTA-Blut über 15 min mit AKBA inkubiert. Die Ausbeute des Nachweisverfahrens lag für diese Substanz minimal unter der Wiederfindungsrate von KBA, so dass kein Anhalt für eine deutliche Metabolisierung der ins Blut zugesetzten Substanzmenge an AKBA bestand.

Im Tierversuch mit Wistar-Ratten wurden nach oraler bzw. intravenöser Verabreichung von 5 mg KBA bzw. AKBA beide Boswelliasäuren im Blut detektiert. Auch bei Ratten sind verschiedene deacetylierende Enzymaktivitäten bekannt (Haugen, 1974; Yeh, 1982; Zeng, 1999). Ein Hinweis auf eine rasche Deacetylierung von AKBA konnte bei der verwendeten Dosierung bei den Tieren nicht bestätigt werden. Letztlich muß bei der Frage nach einer raschen Deacetylierung von AKBA berücksichtigt werden, dass sowohl die Bioverfügbarkeit als auch der Metabolismus eines Pharmakons dosisabhängige Größen darstellen. Bei hohen Dosen eines Arzneistoffes kann beispielsweise eine Sättigung einer metabolischen Enzymaktivität auftreten (Forth et al., 1996).

4.2.9. Passage der Blut-Hirn-Schranke durch Boswelliasäuren

Angeichts ihrer Lipophilie sind Boswelliasäuren potentiell liquorgängige Substanzen, wobei dieser Charakterzug der Arzneistoffe im vorgestellten Tierversuch bestätigt werden konnte. Von beiden Boswelliasäuren fanden sich Spuren im Hirngewebe der Wistar-Ratten (nach oraler Medikation 161ng KBA und 379ng AKBA, nach i.v.-Medikation 198ng KBA und 515ng AKBA pro 0,5 g Trockengewebe). Die Tatsache, dass sich AKBA nachweisen ließ, ist in Hinblick auf eine antiproliferative Wirksamkeit bei zerebralen Tumorerkrankungen bedeutsam, insbesondere da es Hinweise darauf gibt, dass AKBA unter den Boswelliasäuren die größte cytotoxische Potenz besitzt (Shao, 1998). In Zellkulturen zeigten Boswelliasäuren cytotoxische Aktivität im mikromolaren Konzentrationsbereich (IC 50 = 0,6-10 mikroMol) (Shao, 1998; Hörnlein, 1999, Huan, 2000). Die im Hirngewebe der beiden Wistar-Ratten gefundenen Substanzmengen an KBA bzw. AKBA sprechen dafür, dass selbst bei intakter Blut-Hirn-Schranke durch entsprechende Dosierung zytotoxische Konzentrationen erreicht werden können.

5. Zusammenfassung

In der experimentellen Arbeit konnten Methoden zur Untersuchung von pharmakokinetischen Eigenschaften von 11-keto- β -Boswelliasäure (KBA) und Acetyl-11-keto- β -Boswelliasäure (AKBA) entwickelt werden. Durch Blutspiegelmessungen bei Probanden und Patienten sowie auch im Tierversuch konnte die orale Bioverfügbarkeit von KBA nachgewiesen werden. Die Detektion von AKBA im menschlichen Blut nach Einnahme von H15-Tabletten zeigte bei der eingesetzten Dosierung in den meisten Fällen nur kleinste Spuren. Im Tierexperiment wurde eine orale sowie intravenöse Bioverfügbarkeit von AKBA dokumentiert.

Im Tierversuch konnte die Passage der Blut-Hirn-Schranke durch beide Boswelliasäuren gezeigt werden, indem Gewebespiegel von KBA und AKBA im Hirn detektiert wurden. Dies ist in Hinblick auf eine mögliche antiproliferative Wirksamkeit bei malignen Tumorerkrankungen des zentralen Nervensystems von Bedeutung. Anhand von Blutuntersuchungen bei freiwilligen Probanden konnte gezeigt werden, dass eine Erhebung pharmakokinetischer Parametern mit den vorgestellten Methoden möglich ist. Die Bestimmung von Bioverfügbarkeit, Halbwertszeit, Verteilungsvolumen und Clearance – erfordert die Durchführung von weitergehenden, umfangreichen Versuchsreihen. Ausführliche pharmakokinetische und auch toxikologische Untersuchungen würden eine wichtige Grundlage für die Zulassung von Boswelliasäuren als Arzneimittel darstellen.

6. Engelsprachige Zusammenfassung

Summary:

This study developed approaches for the pharmacokinetic analysis of 11-keto- β -boswellic acid (KBA) and Acetyl-11-keto- β -boswellic acid (AKBA). An HPLC assay for the determination of the boswellic acids in blood was evaluated. KBA was quantitated in human blood of patients and healthy subjects after administration of a commercial Boswellia extract (H15). Only very small amounts of AKBA could be detected in humans. An animal trial demonstrated an oral and intravenous bioavailability of both KBA and AKBA.

The animal model showed concentrations of KBA and AKBA after administration of both boswellic acids in brain tissue. This finding is relevant to a possible therapeutical use of boswellic acids in malignant gliomas.

The developed analytical procedures were shown to be suitable for pharmacokinetic analyses of boswellic acids. Pharmacokinetic and toxicologic studies represent a prerequisite for the registration of boswellic acids as medicaments.

7. Literaturverzeichnis

1. **Abbott, N. J.** 2000. Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability *Cell Mol Neurobiol.* **20**:131-47.
2. **Abbott, N. J., and P. A. Revest** 1991. Control of brain endothelial permeability *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* **3**:39-72.
3. **Albert, F.K.** 1994. early postoperative magnetic resonance imaging after resection of malignant glioma: objective evaluation of residual tumor and its influence on regrowth and prognosis *Neurosurgery.* **34**:45-60
4. **Ammon, H. P., H. Safayhi, T. Mack, and J. Sabieraj** 1993. Mechanism of antiinflammatory actions of curcumine and boswellic acids *J Ethnopharmacol.* **38**:113-9.
5. **Ammon, H. P. T., Mack, T., Singh, G.B., and H. Safayhi** 1991. Inhibition of leukotriene B₄ formation in rat peritoneal neutrophils by an ethanolic extract of the gum resin exsudate of *Boswellia serrata*. *Planta Med.* **57**:203-207.
6. **Andrus, P. K., B. M. Taylor, F. F. Sun, and E. D. Hall** 1994. Effects of the lipid peroxidation inhibitor tirilazad mesylate (U-74006F) on gerbil brain eicosanoid levels following ischemia and reperfusion *Brain Res.* **659**:126-32.
7. **Arai H.** 2002. Platelet-activating factor acetylhydrolase Prostaglandins Other Lipid Mediat. **68-69**: 83-94.
8. **Arai H., H. Koizumi, J. Aoki, and K.Inoue** 2002. Platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) *J Biochem (Tokyo).* **131**: 635-40
9. **Baba, T., K. L. Black, K. Ikezaki, K. N. Chen, and D. P. Becker** 1991. Intracarotid infusion of leukotriene C₄ selectively increases blood- brain barrier permeability after focal ischemia in rats *J Cereb Blood Flow Metab.* **11**:638-43.
10. **Baba, T., C. C. Chio, and K. L. Black** 1992. The effect of 5-lipoxygenase inhibition on blood-brain barrier permeability in experimental brain tumors *J Neurosurg.* **77**:403-6.

11. **Bailey P, C. H.** 1926. A Classification of tumors of the glioma group on a histogenetic basis with a correlated study of prognosis Philadelphia, Lippincott.
12. **Baskaya, M. K., Y. Hu, D. Donaldson, M. Maley, A. M. Rao, M. R. Prasad, and R. J. Dempsey** 1996. Protective effect of the 5-lipoxygenase inhibitor AA-861 on cerebral edema after transient ischemia J Neurosurg. **85**:112-6.
13. **Bitzer, M., H. Opitz, J. Popp, M. Morgalla, A. Gruber, E. Heiss, and K. Voigt** 1998. Angiogenesis and brain oedema in intracranial meningiomas: influence of vascular endothelial growth factor Acta Neurochir. **140**:333-40.
14. **Black, K. L., T. Baba, and W. M. Pardridge** 1994. Enzymatic barrier protects brain capillaries from leukotriene C4 J Neurosurg. **81**:745-51.
15. **Black, K. L., and J. T. Hoff** 1985. Leukotrienes increase blood-brain barrier permeability following intraparenchymal injections in rats Ann Neurol. **18**:349-51.
16. **Black, K. L., J. T. Hoff, J. E. McGillicuddy, and S. S. Gebarski** 1986. Increased leukotriene C4 and vasogenic edema surrounding brain tumors in humans Ann Neurol. **19**:592-5.
17. **Black, K. L., W. A. King, and K. Ikezaki** 1990. Selective opening of the blood-tumor barrier by intracarotid infusion of leukotriene C4 J Neurosurg. **72**:912-6.
18. **Boden, S. E., S. Schweizer, T. Bertsche, M. Dufer, G. Drews, and H. Safayhi** 2001. Stimulation of leukotriene synthesis in intact polymorphonuclear cells by the 5-lipoxygenase inhibitor 3-oxo-tirucallic acid Mol Pharmacol. **60**:267-73.
19. **Boeker, D. K., and M. Winking** 1997. Die Rolle von Boswelliasäuren in der Therapie maligner Gliome Deutsches Ärzteblatt. **94**:1197-1199.
20. **Cairncross, G., D. Macdonald, S. Ludwin, D. Lee, T. Cascino, J. Buckner, D. Fulton, E. Dropcho, D. Stewart, C. Schold, Jr., and et al.** 1994. Chemotherapy for anaplastic oligodendroglioma. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group J Clin Oncol. **12**:2013-21.
21. **Chen, YC, and L. Fleckenstein** 2001. Improved assay method for the determination of pyronaridine in plasma and whole blood by high-performance liquid chromatography for

- application to clinical pharmacokinetic studies. *J Chromatogr B Biomed Sci.* **751**:39-46.
22. **Chio, C. C., T. Baba, and K. L. Black** 1992. Selective blood-tumor barrier disruption by leukotrienes *J Neurosurg.* **77**:407-10.
 23. **DeAngelis, L. M., P. C. Burger, S. B. Green, and J. G. Cairncross** 1998. Malignant glioma: who benefits from adjuvant chemotherapy? *Ann Neurol.* **44**:691-5.
 24. **De Angelis, L. M.** 2003. Benefits of adjuvant chemotherapy in high-grade gliomas. *Semin Oncol.* **30** (6 Suppl 19): 15-8.
 25. **DeBault, L. E.** 1981. gamma-Glutamyltranspeptidase induction mediated by glial foot process- to endothelium contact in co-culture *Brain Res.* **220**:432-5.
 26. **el-Khadem, H., Z. M. el-Shafei, M. A. el-Sekeily, and M. M. Rahman** 1972. Derivatives of boswellic acids *Planta Med.* **22**:157-9.
 27. **Fine, H. A., K. B. Dear, J. S. Loeffler, P. M. Black, and G. P. Canellos** 1993. Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults *Cancer.* **71**:2585-97.
 28. **Fortin, D., G. J. Cairncross, and R. R. Hammond** 1999. Oligodendroglioma: an appraisal of recent data pertaining to diagnosis and treatment *Neurosurgery.* **45**:1279-91; discussion 191.
 29. **Glaser, T., S. Winter, P. Groscurth, H. Safayhi, E. R. Sailer, H. P. Ammon, M. Schabet, and M. Weller** 1999. Boswellic acids and malignant glioma: induction of apoptosis but no modulation of drug sensitivity *Br J Cancer.* **80**:756-65.
 30. **Greenberg, M. S.** 2001. *Handbook of neurosurgery*, Fifth edition Thieme Medical Publishers, New York.
 31. **Gupta, O. P., N. Sharma, and D. Chand** 1994. Application of papaya latex-induced rat paw inflammation: model for evaluation of slowly acting antiarthritic drugs *J Pharmacol Toxicol Methods.* **31**:95-8.
 32. **Forth, W, D. Henschler, W. Rummel, and K. Starke** 1996. *Pharmakologie und Toxikologie.* 7. Auflage ed Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin Oxford.

33. **Hall, W. A.** 1998. The safety and efficacy of stereotactic biopsy for intracranial lesions *Cancer*. **82**:1749-55.
34. Haugen, D.A., and J.W. Suttie 1974. Purification and properties of rat liver microsomal esterases *J Biol Chem*. **249**: 2717-22.
35. **Heldt RM, S. T., Winking M, Sailer ER, Safahyi H, Ammon HPT and Simmet Th** 1997. Boswellic acids exhibit cytotoxic effects on brain tumor cells independent from 5-lipoxygenase inhibition. *Naunyn-S-Arch Pharmacol*. **355**:30.
36. **Hess, K. R.** 1999. Extent of resection as a prognostic variable in the treatment of gliomas *J Neurooncol*. **42**:227-31.
37. **Hoernlein, R. F., T. Orlikowsky, C. Zehrer, D. Niethammer, E. R. Sailer, T. Simmet, G. E. Dannecker, and H. P. Ammon** 1999. Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid induces apoptosis in HL-60 and CCRF-CEM cells and inhibits topoisomerase I *J Pharmacol Exp Ther*. **288**:613-9.
38. **Huan, M. T., V. Badmaev, Y. Ding, Y. Liu, J. G. Xie, and C. T. Ho** 2000. Anti-tumor and anti-carcinogenic activities of triterpenoid, beta-boswellic acid *Biofactors*. **13**:225-30.
39. **Imaizumi, S, T. Kondo, M.A. Deli, G. Gobbel, C.j. Epstein, T Yoshimoto, P.H. Chan** 1996. The influence of oxygen free radicals on the permeability of the monolayer of cultured brain endothelial cells. *Neurochem Int*. **29**: 205-11
40. **Janssen, G., U. Bode, H. Breu, B. Dohrn, V. Engelbrecht, and U. Gobel** 2000. Boswellic acids in the palliative therapy of children with progressive or relapsed brain tumors *Klin Padiatr*. **212**:189-95.
41. **Kapil, A., and N. Moza** 1992. Anticomplementary activity of boswellic acids--an inhibitor of C3-convertase of the classical complement pathway *Int J Immunopharmacol*. **14**:1139-43.
42. **Keppler, D., M. Huber, T. Baumert and A. Guhlmann** 1989. Metabolic inactivation of leukotrienes. *Adv Enzyme Regul*. **28**:307-19.
43. **Kiwak, K. J., M. A. Moskowitz, and L. Levine** 1985. Leukotriene production in gerbil brain after ischemic insult, subarachnoid hemorrhage, and concussive injury *J Neurosurg*. **62**:865-9.

44. **Kleihues, P., and L. H. Sobin** 2000. World Health Organization classification of tumors Cancer. **88**:2887.
45. **Kreck, C., and R. Saller** 1999. [Herbal drugs of foreign cultures and medical systems exemplified by Indian incense. Considerations regarding social and insurance medicine expert assessment] *Versicherungsmedizin*. **51**:122-7.
46. **Kudo, S., K. Umehara, M. Hosokawa, G. Miyamoto, and T. Satoh** 2000. Phenacetine deacetylase activity in human liver microsomes: distribution, kinetics, and chemical inhibition and stimulation *J Pharmacol Exp Ther*. **294**:80-8
47. **Levin, V. A., W. K. Yung, J. Bruner, A. Kyritsis, N. Leeds, M. J. Gleason, K. R. Hess, C. A. Meyers, S. A. Ictech, E. Chang, and M. H. Maor** 2002. Phase II study of accelerated fractionation radiation therapy with carboplatin followed by PCV chemotherapy for the treatment of anaplastic gliomas *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. **53**:58-66.
48. **Mabe, H., H. Nagai, and T. Suzuka** 1990. Role of brain tissue leukotriene in brain oedema following cerebral ischaemia: effect of a 5-lipoxygenase inhibitor, AA-861 *Neurol Res*. **12**:165-8.
49. **McIntyre I.M., M.L. Syrjanen, K. Crump, S. Horomidis, A.W. Peace, and O.H. Drummer** 1993. Simultaneous HPLC gradient analysis of 15 bezodiazepines selected metabolites in postmortem blood *J Anal Toxicol*. **17**: 202-7.
50. **Miehle, W.** 1995. [Chronic polyarthritits--treatment with alternative medicine. How frequent is (self-) therapy with alternative methods?] *Fortschr Med*. **113**:81-5.
51. **Miller, R.B., D.Dadgar, and M. Lalande** 1993. High-performance liquid chromatographic method for the determination of indapamide in human whole blood *J Chromatogr*. **614**: 293-8.
52. **Moskowitz, M.A., K.J. Kiwak, K.Hekimian, and I. Levine** 1984. Synthesis of compounds with properties of leukotrienes C4 and D4 in gerbil brains after ischemia and reperfusion. *Science*. **224** (4651):886-9.

53. **Namura, Y., H. Shio, and J. Kimura** 1994. LTC₄/LTB₄ alterations in rat forebrain ischemia and reperfusion and effects of AA-861, CV-3988 Acta Neurochir Suppl. **60**:296-9.
54. **Ostertag, C. B., H. D. Mennel, and M. Kiessling** 1980. Stereotactic biopsy of brain tumors Surg Neurol. **14**:275-83.
55. **Pardhy, R. S. a. B., S.C.** 1978. β -Boswellic acid, acetyl- β -boswellic acid, acetyl-11-keto- β -boswellic acid & 11-keto- β -boswellic acid, four pentacyclic triterpene acids from the resin of *Boswellia serrata* Roxb. Indian Journal of Chemistry. **16B**:176-178.
56. **Peters-Golden, M.** 1998. Molecular mechanisms of leukotriene synthesis: the changing paradigm Clin Exp Allergy. **28**:1059-65.
57. **Poeck, K. H., Werner** 1998. Neurologie, 10. Auflage ed. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
58. **Pushkin, A., G. Carpenito, N. Abuladze, D. Newman, V. Tsuprun, S. Ryazantsev, S. Motemoturu, P. Sassani, N.Solovieva, and R. Dukkipati** 2004. Structural characterization, tissue distribution and functional expression of murine aminoacylase III. Am J Physiol Cell Physiol. **286**: C848-56.
59. **Safayhi, H., Rall, B., Sailer, E.-R., Ammon H.P.T.** 1996. Ihibition by Boswellic Acids of Human Leukocyte Elastase Pharmacology and Experimental Therapeutics.
60. **Safayhi, H., Sailer,E.-R. AND Ammon, H.P.T.** 1995. Mechanism of 5-Lipoxygenase inhibition by acetyl-11-keto- β -boswellic acid Mol.Pharmacol. **47**:1212-1216.
61. **Safayhi, H., S. E. Boden, S. Schweizer, and H. P. Ammon** 2000. Concentration-dependent potentiating and inhibitory effects of *Boswellia* extracts on 5-lipoxygenase product formation in stimulated PMNL Planta Med. **66**:110-3.
62. **Safayhi, H., T. Mack, J. Sabieraj, M. I. Anazodo, L. R. Subramanian, and H. P. Ammon** 1992. Boswellic acids: novel, specific, nonredox inhibitors of 5-lipoxygenase J Pharmacol Exp Ther. **261**:1143-6.
63. **Safayhi, H., B. Rall, E. R. Sailer, and H. P. Ammon** 1997. Inhibition by boswellic acids of human leukocyte elastase J Pharmacol Exp Ther. **281**:460-3.

64. **Sailer, E. R., S. Schweizer, S. E. Boden, H. P. Ammon, and H. Safayhi** 1998. Characterization of an acetyl-11-keto-beta-boswellic acid and arachidonate-binding regulatory site of 5-lipoxygenase using photoaffinity labeling *Eur J Biochem.* **256**:364-8.
65. **Sailer, E. R., L. R. Subramanian, B. Rall, R. F. Hoernlein, H. P. Ammon, and H. Safayhi** 1996. Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid (AKBA): structure requirements for binding and 5-lipoxygenase inhibitory activity *Br J Pharmacol.* **117**:615-8.
66. **Samuelsson, B.** 2000. The discovery of the leukotrienes *Am J Respir Crit Care Med.* **161**:S2-6.
67. **Samuelsson, B.** 1987. An elucidation of the arachidonic acid cascade. Discovery of prostaglandins, thromboxane and leukotrienes *Drugs.* **33**:2-9.
68. **Samuelsson, B.** 1983. Leukotrienes: a new class of mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.* **11**:1-13.
69. **Samuelsson, B.** 1981. Leukotrienes: mediators of allergic reactions and inflammation *Int Arch Allergy Appl Immunol.* **66**:98-106.
70. **Sawin, P. D., P. W. Hitchon, K. A. Follett, and J. C. Torner** 1998. Computed imaging-assisted stereotactic brain biopsy: a risk analysis of 225 consecutive cases *Surg Neurol.* **49**:640-9.
71. **Schilling, L., and M. Wahl** 1999. Mediators of cerebral edema. *Adv Exp Med Biol.* **474**: 123-41.
72. **Schilling, L., and M. Wahl** 1997. Brain edema: pathogenesis and therapy *Kidney Int Suppl.* **59**:S69-75.
73. **Schweizer, S., A. F. von Brocke, S. E. Boden, E. Bayer, H. P. Ammon, and H. Safayhi** 2000. Workup-dependent formation of 5-lipoxygenase inhibitory boswellic acid analogues *J Nat Prod.* **63**:1058-61.
74. **Seregi, A., T. Simmet, A. Schobert, and G. Hertting** 1990. Characterization of cysteinyl-leukotriene formation in primary astroglial cell cultures *J Pharm Pharmacol.* **42**:191-3.

75. **Shao, Y., C. T. Ho, C. K. Chin, V. Badmaev, W. Ma, and M. T. Huang** 1998. Inhibitory activity of boswellic acids from *Boswellia serrata* against human leukemia HL-60 cells in culture *Planta Med.* **64**:328-31.
76. **Sharma, M. L., S. Bani, and G. B. Singh** 1989. Anti-arthritic activity of boswellic acids in bovine serum albumin (BSA)-induced arthritis *Int J Immunopharmacol.* **11**:647-52.
77. **Simmet, T., W. Luck, W. K. Delank, and B. A. Peskar** 1989. Biosynthesis of cysteinyl-leukotrienes by human brain tissue in vitro *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.* **19**:402-6.
78. **Simmet, T., W. Luck, M. Winking, W. K. Delank, and B. A. Peskar** 1990. Identification and characterization of cysteinyl-leukotriene formation in tissue slices from human intracranial tumors: evidence for their biosynthesis under in vivo conditions *J Neurochem.* **54**:2091-9.
79. **Simmet, T., Zugmaier W. und Büchele, B.** 2004. Analytik von pentazyklischen Triterpenen aus Weihrauchharz, Weihrauch-Extrakt Kapseln und H15 Tabletten. *GIT Labor-Fachzeitschrift.* **2**: 123-127
80. **Singh, G. B. u. A., C:K:** 1986. Pharmacology of an extract of salai gugal ex-*Boswellia serrata*, a new non-steroidal anti-inflammatory agent. *Agents and Actions.* **18**:407-412.
81. **Streffler, J., M. Schabet, M. Bamberg, E. H. Grote, R. Meyermann, K. Voigt, J. Dichgans, and M. Weller** 2000. A role for preirradiation PCV chemotherapy for oligodendroglial brain tumors *J Neurol.* **247**:297-302.
82. **Syrovets, T., B. Buchele, E. Gedig, J. R. Slupsky, and T. Simmet** 2000. Acetyl-boswellic acids are novel catalytic inhibitors of human topoisomerases I and IIalpha *Mol Pharmacol.* **58**:71-81.
83. **Tawab, M. A., A. Kaunzinger, U. Bahr, M. Karas, M. Wurglics, and M. Schubert-Zsilavecz** 2001. Development of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of 11-keto-beta-boswellic acid in human plasma *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* **761**:221-7.
84. **Teuscher, E.** 1997. Biogene Arzneimittel, vol. 5., überarb. und erw. Aufl. Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart.

85. **Unterberg, A., M. Wahl, F. Hammersen, and A. Baethmann** 1987. Permeability and vasomotor response of cerebral vessels during exposure to arachidonic acid *Acta Neuropathol.* **73**:209-19.
86. **Weller, M.** 2002. Primäre Hirntumoren und ZNS-Metastasen, 3.Auflage ed, Interdisziplinäres Tumorzentrum, Klinikum Eberhard-Karls-Universität Tübingen.(medizin.uni-tuebingen.de/itz/pdfinhal/hirn.pdf.;08.07.2002)
87. **Weller, M., B Muller, R. Koch, M. Bamberg and P. Krauseneck** 2003 Neuro-Oncology Working Group 01 trial of nimustine plus teniposide versus nimustine plus cytarabine chemotherapy in addition to involved-field radiotherapy in the first-line treatment of malignant glioma. *J Clin Oncol.* **21**: 3276-84.
88. **Winking, M., W. Deinsberger, A. Joedicke, and D. K. Boeker** 1998. Cysteinyl-leukotriene levels in intracerebral hemorrhage: an edema- promoting factor? *Cerebrovasc Dis.* **8**:318-26.
89. **Winking, M., R. M. Heldt, and T. Simmet** 1996. Thrombin stimulates activation of the cerebral 5-lipoxygenase pathway during blood-brain cell contact *J Cereb Blood Flow Metab.* **16**:737-45.
90. **Winking, M., S. Sarikaya, A. Rahmanian, A. Jodicke, and D. K. Boker** 2000. Boswellic acids inhibit glioma growth: a new treatment option? *J Neurooncol.* **46**:97-103.
91. **Wolfram K.M., and T.D. Bjornsson** 1980. High-performance liquid chromatography analysis of dipyridamole in plasma and whole blood *J Chromatogr.* **183**: 57-64.
92. **Wong, E. T., K. R. Hess, M. J. Gleason, K. A. Jaeckle, A. P. Kyritsis, M. D. Prados, V. A. Levin, and W. K. Yung** 1999. Outcomes and prognostic factors in recurrent glioma patients enrolled onto phase II clinical trials *J Clin Oncol.* **17**:2572.
93. **Woo, E.W., R. Messmann, E.A. Sausville, W.D. Figg** 2001. Quantitative determination of perifosine, a novel alkylphosphocholine anticancer agent, in human plasma by reversed-phase liquid chromatography-electrospray mass spectrometry *J Chromatogr B.* **759**: 247-257.

94. **Yasuma, Y., A. Strasser, C. Ruetzel, R.M. McCarron, and M.Spatz** 1997. The effect of nitric oxide inhibition on ischemic brain edema. *Acta Neurochir Suppl.* **70**: 202-5.
95. **Yeh, S.Y.** 1982. Localization and characterization of meperidine esterase of rats *Drug Metab Dispos.* **10**: 319-25.
96. **Yung, W. K.** 2000. Temozolomide in malignant gliomas *Semin Oncol.* **27**:27-34.
97. **Yung, W. K., M. D. Prados, R. Yaya-Tur, S. S. Rosenfeld, M. Brada, H. S. Friedman, R. Albright, J. Olson, S. M. Chang, A. M. O'Neill, A. H. Friedman, J. Bruner, N. Yue, M. Dugan, S. Zaknoen, and V. A. Levin** 1999. Multicenter phase II trial of temozolomide in patients with anaplastic astrocytoma or anaplastic oligoastrocytoma at first relapse. Temodal Brain Tumor Group *J Clin Oncol.* **17**:2762-71.
98. **Zeng, Z, and N.W. Andrew** 1999 Characterization of eprinomectin N-deacetylase in rats. *Drug Metab Dispos.* **27**:269-73.

8. Abkürzungsverzeichnis

AKBA:	Acetyl-Keto- β -Boswellic-Acid
BCNU:	Bischlorethyl Nitrosourea = Carmustin
CCNU:	Chloroethyl-Cyclohexyl Nitrosourea = Lomustin
ESI:	Electronic Spray Ionization
HPLC:	High Performance Liquid Chromotography
IC 50:	Inhibitory Concentration 50%
KBA:	Keto- β -Boswellic-Acid
MALDI:	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MS:	Mass Spectrometry
PCV:	Procarbazin + CCNU + Vincristin
SPE:	Solid Phase Extraction
TOF:	Time of Flight

9. **Erklärung**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

10. Lebenslauf

Anke Heidemeier

Geboren: 15. Juli 1975 in Eichstätt (Bayern)
Eltern: Renate und Günter Heidemeier

Schulische Ausbildung:

09 / 1982 – 07 / 1986 Grundschule St. Walburg in Eichstätt
09 / 1986 – 06 / 1995 Willibald-Gymnasium Eichstätt

Hochschulausbildung:

10 / 1995 – 04/2002 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen

04 / 2001 – 04 / 2002 Praktisches Jahr
 - Neurochirurgische Klinik
 - Klinik für Allgemeinchirurgie / Unfallchirurgie
 - Medizinische Klinik

 der Justus-Liebig-Universität Gießen

Beruflicher Werdegang:

09/2002 – 02/2004 Ärztin im Praktikum
 in der Neurochirurgischen Universitätsklinik
 Heidelberg

Seit 04/2004 Assistenzärztin im Institut für
 Röntgendiagnostik der Universität Würzburg

11. Danksagung

Für die Überlassung des Themas zu dieser Arbeit sowie für die freundliche Unterstützung, die mir bei der Erarbeitung zuteil wurde, möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Michael Winking herzlich bedanken.

Ich möchte mich des Weiteren sehr bedanken für die gute Zusammenarbeit mit dem Biochemischen Institut der Justus-Liebig-Universität Giessen ¹. Mein ganz besonderer Dank gilt hier Herrn PD Dr. Günter Lochnit für seine fachliche Unterstützung sowie seinen ausdauernden persönlichen Einsatz bei der Lösung von Problemstellungen.

Mein weiterer Dank gilt dem Physiologischen Institut der Justus-Liebig-Universität Giessen ² für die freundliche Überlassung von geopferten Ratten zur Entnahme von Organen und Blutproben.

Herrn Prof. Dr. H. Zahner vom Institut für Parasitologie der Justus-Liebig-Universität Giessen ³ danke ich für die Beratung und praktische Unterstützung bei der Durchführung von Tierversuchen.

1 Biochemisches Institut
Friedrichstr. 24 • 35392 Giessen
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Klaus Preissner

2 Physiologisches Institut
Aulweg 129 • 35392 Giessen
Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. Dr. Michael Piper

3 Institut für Parasitologie
Rudolf-Buchheim-Straße 2 • 35392 Gießen
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. H. Zahner

Anke Heidemeier.